

NEM KONVENCIONÁLIS KÖZEGEKBEN LEJÁTSZÓDÓ ENZIMKATALITIKUS ÉSZTEREZÉSI REAKCIÓK VIZSGÁLATA

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS



GUBICZA LÁSZLÓ

PANNON EGYETEM
Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém
2008

TARTALOMJEGYZÉK

	BEVEZETÉS	1
1.	IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	4
1.1.	Az enzimek működése, kémiai szerkezete, tulajdonságai	4
1.1.2.	Az enzimek katalitikus jellemzői	5
1.1.2.1.	Az enzimek aktivitása	5
1.1.2.2.	Az enzimek szelektivitása, enantioszelektivitása	5
1.1.2.3.	Az enzimek stabilitása, dezaktiválódás	8
1.2.	Az enzimműködést befolyásoló legfontosabb paraméterek	11
1.3.	Az enzimkatalizátorok módosításának lehetőségei	12
1.3.1.	Fehérjemérnökség	12
1.3.2.	Oldószermérnökség	13
1.3.3.	Enzimek kémiai módosítása	13
1.4.	Nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciók	14
1.4.1.	Nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciók szerves oldószerben	15
1.4.1.1.	A szerves reakcióközeg és annak víztartalmának hatása az enzimekre	15
1.4.1.2.	Kezdeti vízakktivitás beállítása telített sóoldatokkal	16
1.4.1.3.	Vízakktivitás beállítás gőztéren keresztül	17
1.4.1.4.	Vízakktivitás beállítás membránon keresztül telített sóoldatokkal	18
1.4.1.5.	Vízakktivitás beállítás sóhidrátpárokkal	18
1.4.1.6.	Vízakktivitás beállítás pervaporációval	19
1.4.1.7.	Az oldószer hatása az enzimek aktivitására és szelektivitására	19
1.4.2.	Ionos folyadékok	22
1.4.3.	Szuperkritikus folyadékok	26
1.4.4.	Oldószermentes és szilárd-gáz rendszerek	27
1.4.5.	Kombinált technológiák	29
1.5.	Az alkalmazott enzimek	30
1.5.1.	A <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim szerkezete	30
1.5.2.	A <i>Candida antartica</i> lipáz B enzim szerkezete	32
1.6.	Királis szubsztátumok rezolválási reakciói szerves közegben	33
1.6.1.	Profének reakciói	34
1.6.2.	A 2-szubsztituált karbonsavak enzimkatalitikus észterezése	34
1.7.	Aroma észterek előállítása nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciókkal	36
1.7.1.	Az etil-acetát előállítása	38
1.7.2.	Az izoamil-acetát előállítása	38
1.7.2.1.	Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása szerves oldószerben	38
1.7.2.2.	Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása oldószermentes közegben	40
1.7.2.3.	Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása szuperkritikus folyadékban	41
1.7.2.4.	Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása ionos folyadékban	41
1.8.	Biokenőanyag előállítása	41
1.8.1.	Zsírsavak és rövid szénláncú alkoholok észterezése	41
1.8.2.	Az észterezés kinetikai vizsgálata	43
1.9.	Glicerín-monosztearát előállítása szerves oldószerben	46
1.9.1.	Glicerín-monosztearát előállítása hidrolízissel	46
1.9.2.	Glicerín-monosztearát előállítása észterezéssel	46
1.10.	Célkitűzések	48

2.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	50
2.1.	Anyagok	50
2.1.1.	Enzimek és vegyszerek	50
2.1.2.	Membránok	53
2.2.	Kísérleti módszerek, eljárások	54
2.2.1.	Az (<i>R,S</i>)-2-szubsztituált-propionsavak és 1-butanol észterezési reakciójának vizsgálata	54
2.2.1.1.	Reakció rázóinkubátorban	54
2.2.1.2.	Vízadszorpciós izotermák felvétele	54
2.2.1.3.	Ionos folyadékok log P értékeinek meghatározása „rázótolcséres” módszerrel	55
2.2.2.	Etil-acetát előállítása vizsgálata	55
2.2.2.1.	Reakció rázóinkubátorban	55
2.2.2.2.	Reakció és pervaporáció integrálása	55
2.2.3.	Izoamil-acetát előállítása vizsgálata	56
2.2.3.1.	Reakció rázóinkubátorban	56
2.2.3.2.	A komponensek megoszlásának vizsgálata	56
2.2.3.3.	Az enzim hőstabilitásának vizsgálata	56
2.2.3.4.	Reakció szuperkritikus szén-dioxidban	57
2.2.4.	Biokenőanyag előállítása vizsgálata	58
2.2.5.	Glicerín-monosztearát előállítása vizsgálata	58
2.2.5.1.	Reakció rázóinkubátorban	58
2.2.5.2.	HPLC analízis	59
2.2.6.	Általános módszerek	59
2.2.6.1.	Gázkromatográfiás elemzés	59
2.2.6.2.	Savtartalom meghatározása titrálással	60
2.2.6.3.	Víztartalom meghatározása	61
2.2.6.4.	Vízeltávolítás pervaporációval	61
3.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	62
3.1.	A 2-szubsztituált-propionsavak enzimkatalitikus enantioszelektív észterezése	62
3.1.1.	Az (<i>R,S</i>)-2-szubsztituált-propionsavak és 1-butanol egyensúlyi észterezési reakciója	62
3.1.2.	A víztartalom hatása a <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim működésére	65
3.1.3.	A szerves oldószerek hatása a <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim aktivitására, enantioszelektivitására és stabilitására	68
3.1.3.1.	Kapcsolat a <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim aktivitása, enantioszelektivitása és a szerves oldószerek fizikai-kémiai tulajdonságai között	68
3.1.3.2.	Vízaktivitás beállítás helyett víztartalom beállítás	69
3.1.4.	A <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim szubsztrátspecifikussága 2-szubsztituált propionsavak észterezési reakcióiban	72
3.1.5.	Királis oldószer hatása a <i>Candida rugosa</i> enzim aktivitására és enantioszelektivitására.	75
3.1.6.	Az oldószerek és az enzim hidratáltságának szerepe a <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim stabilitásában	77
3.1.7.	Folyamatos vízeltávolítás heteroazeotróp desztillációval	82
3.1.8.	Az oldószerek hatása az enzim stabilitására	84
3.1.8.1.	Dezaktiváció leírása	84
3.1.8.2.	A vízaktivitás hatása az enzim stabilitására	86
3.1.9.	A <i>Candida rugosa</i> lipáz enzim visszaforgathatósága ionos folyadékokban és szerves oldószerekben	87

3.2.	Aroma észterek előállítása enzimkatalitikus reakcióval	91
3.2.1.	Etil-acetát előállítása	91
3.2.1.1.	Az etil-acetát enzimkatalitikus észterezésének kinetikai vizsgálata szerves oldószerben és oldószermentes közegben	91
3.2.1.2.	Nagylaboratóriumi eljárás kidolgozása etil-acetát előállítására	91
3.2.1.3.	Folyamatos eljárás etil-acetát előállítására ionos folyadékban végzett enzimatis ésterézéssel	100
3.2.2.	Izoamil-acetát előállításának vizsgálata nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakcióval	104
3.2.2.1.	Izoamil-acetát enzimatis előállítás ionos folyadékban	105
3.2.2.2.	Izoamil-acetát enzimatis előállítás oldószermentes közegben	114
3.2.2.3.	Izoamil-acetát enzimatis előállítás szuperkritikus szén-dioxidban és kombinált eljárásban	115
3.2.2.4.	Az enzim hőstabilitásának vizsgálata	117
3.2.2.5.	Az izoamil-acetát kinyerése a reakcióelegyből	119
3.3.	Biokenőanyag előállítás	122
3.3.1.	A reakciósebesség meghatározása	123
3.3.2.	Az enzim immobilizálás hatása az anyagátadásra	125
3.3.3.	Kinetikai analízis	127
3.3.4.	A biokenőanyag előállítás optimális paramétereinek meghatározása	133
3.3.5.	A biokenőanyag tribológia tulajdonságai	134
3.3.6.	A biokenőanyag toxicitásának vizsgálata	136
3.4.	Glicerín-monosztearát előállítás enzimkatalitikus észterézéssel	136
3.4.1.	Kinetikai vizsgálatok	136
3.4.2.	A glicerín-monosztearát előállítás optimális paramétereinek meghatározása	136
4.	ÖSSZEFOGLALÁS	140
5.	IRODALOMJEGYZÉK	144
6.	PUBLIKÁCIÓK	152
7.	FÜGGELEK	157

BEVEZETÉS

Az enzimek biokatalizátorként történő tudatos felhasználása több évtizedes múltra tekint vissza. Az utóbbi években élénk érdeklődés mutatkozott az enzimek kémiai átalakításokban történő alkalmazása iránt. Az enzimtechnológia, mint a biotechnológia egyik fontos ága, gyors fejlődésnek indult. Napjainkban különösen nagy jelentősége van a gyógyszer- és növényvédőszer iparban, ahol sok esetben sikerült a kémiai szintézisnél egyszerűbb úton intermediereket illetve hatóanyag-molekulákat előállítani enzimek vagy mikroorganizmusok segítségével, számos alkalommal magas (enantio)szelektivitással.

E reakciók ismert előnyei a kíméletes reakciókörülmények, tiszta termékek, magas kitermelés és sok esetben a környezetbarát melléktermékek. Eleinte kizárólag vizes közegben végzett biotranszformációkban kerültek az enzimek alkalmazásra, hiszen a különböző élőlényekben is ilyen körülmények között fejtik ki katalitikus aktivitásukat. Később azonban az a felismerés, hogy szerves közegben is képesek katalitikus hatás kifejtésére, intenzív kutatást indított el a szerves kémikusok körében, és egyre több, különböző osztályba tartozó enzimet teszteltek szerves kémiai reakciók katalizátoraiként. Ahhoz, hogy egy enzim vagy mikrobatenyészet alkalmazást nyerhessen, a katalizátorokkal szemben általánosan támasztott elvárásoknak meg kell felelnie, vagyis magas szelektivitást, aktivitást és megfelelő stabilitást kell mutatnia. Ehhez a kinyert enzimeket sok esetben módosítani szükséges, direkt vagy közvetett módon. A „protein engineering” eszközeivel közvetlenül a fehérje természetű enzim molekula szerkezete, aminosavszekvenciája változtatható meg, míg a „medium engineering” az enzimkatalitikus reakció közegének, körülményeinek változtatásával idéz elő az enzim szerkezetében kisebb-nagyobb konformációs változásokat, melynek eredményeképpen kedvezőbb katalitikus tulajdonságokkal rendelkező enzim nyerhető.

A korábban elfogadott általános nézet szerint a biokémiai reakciók vizes oldatokban, fiziológiai hőmérsékleten, normál nyomáson és túlnyomórészt a semleges pH közelében játszódnak le. Ezek a körülmények sokáig összeegyeztethetetlennek tűntek azokkal a feltételekkel, amelyek mellett a kémiai reakciók végbemennek: extrém magas hőmérséklet, nagy nyomás, szélsőséges pH értékek, szerves oldószerek. Klibanov professzor és munkatársai (Massachusetts Institute of Technology) 1985-ben publikált úttörő munkája után fokozott érdeklődés nyilvánult meg az olyan enzimkatalitikus reakciók iránt, amelyek a „biológiai” környezeten kívül is lejátszódnak, és így a vizes fázis korlátozó tényezőit kiküszöbölik. A szerves oldószerek alkalmazásának előnyeit nagyon sok munka vizsgálta, szabadalmak, ipari alkalmazások követték az alap kutatási eredményeket. A szerves oldószerek

alkalmazásakor felmerülő gondokat oldószermentes közegben végzett enzimkatalitikus reakciókkal igyekeztek áthidalni. (Ez valójában nem oldószermentes, hanem a reakció egyik komponensének feleslegében végzett átalakítást jelent. Tény, hogy külön oldószer használatára nincs szükség.)

Az oldószer gyors eltávolítását tette lehetővé a szuperkritikus közegek, elsősorban szuperkritikus szén-dioxid alkalmazása, ahol a nyomás változtatásával befolyásolható volt az oldószer tulajdonsága is. Ez számos esetben komoly könnyebbéget jelentett, ugyanakkor a többszáz bar nyomáson végrehajtott reakciók kivitelezéséhez speciális reaktorokra volt szükség. Az igaznak tűnő megoldást a szerves oldószerek hátrányaira (tűzveszélyesek, nagy párolgási veszteségek) az ionos folyadékok hozták. 2000-ben jelent meg az első közlemény ionos folyadékban lejátszódó enzimkatalitikus reakciókról, amit robbanásszerű fejlődés követett. Nagyon sokan ismerték fel és alkalmazták az ezekben a tervezhető oldószerekben rejlő lehetőségeket. A kezdeti eufóriát a kijózanodás követte: a magas ár, a toxicitási adatok hiánya sok embert elbizonytalanított. Nyolc év alatt sok minden tisztázódott: a magas kereslet hatására az ionos folyadékok ára drasztikusan csökkent, a toxicitási adatok bebizonyították, hogy nem minden ionos folyadék tekinthető „zöld” oldószernek, de a harmadik-negyedik generációs termékek már sokszor jóval kisebb veszélyt jelentenek a környezetre, mint a szerves oldószerek. Az ipari alkalmazások megjelenése pedig végképp az ionos folyadékok csatanyerését jelentik.

Dolgozatomban nem konvencionális közegekben lejátszódó enzimkatalitikus reakciókkal, ezen belül észterezésekkel foglalkozom: szerves oldószerekben, oldószermentes közegben, ionos folyadékokban és szuperkritikus szén-dioxidban végzett vizsgálatok eredményeiről egyaránt beszámolok. A Műszaki Kémiai Kutató Intézet hagyományait követve nemcsak alapkutatási eredmények elérésére törekedtem, hanem igyekeztem azok gyakorlati hasznosítási lehetőségeit is megtalálni. Induláskor a téma világviszonylatban is új volt: hazánkban elsőként kezdtem el kutatni, személyi és módszertani háttér nem állt rendelkezésemre. Az alapkutatási vizsgálatokhoz, a szükséges eszközök beszerzéséhez nagyon jelentős támogatást kaptam az OTKA-tól. 5 pályázat témavezetőjeként illetve vezető kutatójaként (T 4246: „Enzimkatalitikus reakciók enantioszelektivitásának vizsgálat szerves oldószerekben és oldószer elegyekben”; T 015885: A reakcióközeg hatása lipáz enzimek enantioszelektivitására; T 019752: „Az enzim konformáció és specifikusság összefüggésének vizsgálata szerves oldószerekben lejátszódó enzimkatalitikus reakcióknál”; T 031760: „Enzimek termostabilitásának vizsgálata nem konvencionális közegben”; OTKA D 29115: „Természetes aromakomponensek előállítása integrált rendszerben”) szerzett tapasztalatok

alapozták meg a nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciók megismerésének feltételeit. Az OTKA résztvevő kutatóként még további három munkámat támogatta. Az így megszerzett ismereteket és tudást alkalmaztam a külső megbízásos munkákban, melyek közül elsőként kell kiemelni a NITROIL Rt. által finanszírozott feladatokat. Ehhez csatlakoztak a Döhler-Szilas Kft, az Ipari Minisztérium illetve az UNDP megbízásai (Introduction of up-to-date environmental-friendly biotechnological processes based on agricultural wastes to Hungary, 1998), ahol az alapkutatásban szerzett ismereteket alkalmaztam konkrét, gyakorlati feladatok megoldásában. Az idehaza nem elérhető mérési eszközökhöz és új vizsgálati módszerekhez való hozzáférést, továbbá nemzetközi szakmai tapasztalatok megszerzését, diszkussziós lehetőségeket biztosítottak az elnyert kétoldalú TÉT pályázatok (német, lengyel, portugál, szlovák, szlovén, horvát), melyek témavezetőjeként és további, hasonló együttműködések résztvevőjeként nemzetközi szinten tudtam bemutatni, megmérettetni eredményeimet.

Dolgozatom az 1993-ban készített és 1995 kora tavaszán sikeresen megvédett „Enzimkatalitikus észterezés szerves oldószerekben” című, publikációs tevékenység alapján tézisszerűen összeállított kandidátusi értekezés egyenes folytatása és csak az azóta elért tudományos eredményeimet tartalmazza. A vonatkozó irodalom áttekintése után, melyben a [Szerző, évszám] jelölést alkalmaztam a szakirodalmi hivatkozások azonosítására, ismertetem újabb, saját eredményeimet. Az eredmények összegzését követően az irodalmak felsorolása következik, itt a [sorszám] jelölést használtam a saját munkáim megjelölésére, és az idézett mű pontos bibliográfiai adatai a „Publikációk” között lelhetők fel. A dolgozat végén a Függelék található fontos, a dolgozat tartalmát kiegészítő információkkal.

1. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

1.1. Az enzimek működése, kémiai szerkezete, tulajdonságai

Az élő sejtekben a biokémiai reakciók az enzimeknek köszönhetően mennek végbe enyhe körülmények között. Az enzimek szelektíven képesek csökkenteni a kémiai reakciók aktiválási energiáját, lerövidítve ezáltal az egyensúlyi állapot eléréséhez szükséges reakcióidőt. Az aktiválási energia csökkentésén keresztül az enzimek akár 10^{15} -szeresére is növelhetik a kémiai reakciók sebességét [Bommarius, 2004; Buchholz, 2005; Illanes, 2008].

Annak magyarázására, hogy miként csökkentik az enzimek a reakciók aktiválási energiáját, több elmélet született. Az enzimek szerkezetének mélyebb megismerését megelőzően Emil Fischer 1894-ben megalkotta „kulcs-zár elméletét”, amely ugyan megelőzte korának ismereteit, azonban a szubsztrátot és az enzimet, mint merev molekulákat tekintette. A valóságban mindkét molekula állandó fluktuációt végez, konformációjuk változik. Ezeket a molekulamozgásokat figyelembe véve Koshland az „indukált illeszkedés elméletével” azt javasolta, hogy a szubsztrátmolekula konformációs változásokat idéz elő az enzim molekulá szerkezetében, ennek következtében jöhet létre a szubsztrátmolekula megfelelő illeszkedésével az enzim-szubsztrát komplex, melynek létezését már Fischer is feltételezte mintegy 70 évvel korábban. A „torzító mechanizmus elmélet” szerint az enzim és a szubsztrát között olyan erős kötés alakul ki, melynek hatására a szubsztráton belüli egyik kötés deformálódik és a szubsztrát aktivált, átmeneti állapotba kerül. A reakció aktiválási energiájának egy része a létrejövő enzim-szubsztrát kötés energiájából származik.

Az enzimműködés további vizsgálatában igazán nagy fejlődést az jelentett, amikor 1965-ben első ízben sikerült egy enzim, a lizozim térszerkezetét felderíteni. Ma már számos enzim aminosav szekvenciája, sőt térszerkezete fehérje adatbankokban hozzáférhető. Az egyik legismertebb ezek közül a PDB adatbank [Protein Data Bank, 2008].

Az enzimek szerkezete és kémiai illetve katalitikus tulajdonságai szoros összefüggésben vannak. Ezek áttekintéséhez érdemes csoportosítani az enzimeket a kémiai szerkezetük, a környezettűrő képességük és a katalizált reakció alapján.

Kémiai szerkezetüket tekintve, az enzimek egy része egyszerű fehérje makromolekula, mint pl. a ribonukleáz. Számos más enzim esetében a működéshez kofaktor is szükséges. Ez lehet az enzim molekulához erősen kapcsolódó ion, amely közvetlenül részt vesz a katalitikus folyamatban, mint pl. a Zn^{2+} -ion a karboxi-peptidáz működésében, ám az is előfordulhat, hogy a kofaktor csupán a működőképes enzim szerkezetének stabilizálásához szükséges, amelyre példa a Cl^- ionok szerepe az amiláz enzim esetében.

Az enzimek környezettel szembeni hő-, nyomás-, nedvességtartalom és pH-tűrőképességük alapján lehetnek mezofilek vagy extremofilek. A mezofil enzimek - természetes körülmények között - vizes környezetben, 30-40 °C-os hőmérsékleten, légköri nyomáson és semleges körüli pH értéken fejtenek ki maximális katalitikus aktivitást. Az extremofil enzimeken belül további felosztás tehető az alapján, hogy milyen külső paraméterrel szemben mutatnak különösen jó tűrőképességet. A termofil és a hipertermofil enzimek számára a magas (jóval a víz forráspontja feletti), a pszichrofil enzimeknek a 15 °C alatti hőmérséklet, az extrém acidofileknek a 3-as, vagy az alatti savas pH, az alkalifileknek a 10-es pH feletti lúgos környezet, a barofileknek a nagy nyomás, míg a xerotoleráns enzimek számára a vízmentes, vagy alacsony vízaktivitású száraz környezet biztosítja az eredeti, natív konformációt. Az extremofil enzimek gyakran nemcsak egy, hanem több „extrém” körülménnyel szemben is ellenállóak. Jó példát nyújtanak erre a vulkáni kráterek mikroorganizmusainak enzimek, amelyek a magas hőmérsékletet és nagy nyomást egyaránt tolerálják.

1.1.2. Az enzimek katalitikus jellemzői

Az enzimkatalizátorok hatékonyságát, „teljesítményét” három jellemzővel szokás leírni, melyek az aktivitás, a szelektivitás és a stabilitás [Bommarius, 2004; Buchholz, 2005].

1.1.2.1. Az enzimek aktivitása

A kereskedelmi forgalomban kapható enzimek aktivitását az adott enzim alosztályra jellemző reakcióban mérik, és U/mg egységben fejezik ki. Az aktivitásméréshez enzimenként eltérő szubsztrátot használnak, ezt a kereskedelmi enzim specifikációja tartalmazza. Pl. a nyers *Candida rugosa* enzim esetében az 1 U aktivitás megfelel azon enzimmennyiségnek, amely percenként 1 μ mol oleinsavat szabadít fel 8-as pH-án, 37 °C-on triolein hidrolízise során.

1.1.2.2. Az enzimek szelektivitása, enantioszelektivitása

Az enzimek - szemben a kémiai katalizátorokkal, - többféle funkciós csoporttal rendelkező szubsztrátok esetében csak egyféle funkciós csoport reakcióját katalizálják (kemoszelektivitás). Térszerkezetüknek köszönhetően képesek megkülönböztetni a szubsztrát különböző helyein található azonos típusú funkciós csoportokat (regioszelektivitás). Mivel L-aminosavakból épülnek fel, királis katalizátorok, melyek az enzim-szubsztrát komplex kialakulásakor a szubsztrátmolekulában található kiralitást felismerik. Prokirális

szubsztrátokból így optikailag aktív termék nyerhető, racém szubsztrátból kiindulva pedig a két enantiomer átalakulásához szükséges aktiválási energiát eltérő mértékben csökkentik, így enantiomer szeparáció valósítható meg [Segel, 1975; Taylor, 2002].

Kinetikai rezolváláskor a racém szubsztrát (*R*)- és (*S*)-enantiomerei kompetitív reakciókban alakulnak át. A két enantiomer reakciójának relatív sebessége határozza meg az enzim enantioszelektivitását. Az enantiomer arány kifejezésére a kompetitív reakciók specifikussági konstansainak hányadosát használjuk, amelyek az elemi részlépések sebességi állandóinak segítségével fejezhetők ki. Michaelis-Menten kinetikát feltételezve az enzim a szubsztráttal reverzibilis reakcióban képez enzim-szubsztrát komplexet, amely szintén reverzibilis reakcióban alakul át enzimmé és termékké. A specifikussági konstans pszeudo-elsőrendű sebességi konstansok segítségével az alábbi módon fejezhető ki:

$$\frac{k_{kat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad \text{E-1.1.}$$

Ha az enzim-szubsztrát kialakulása a sebességmeghatározó, akkor $k_2 \gg k_{-1}$ és $\frac{k_{kat}}{K_m} = k_1$. Ekkor

$$E = \frac{k_1^R}{k_1^S}.$$

Amennyiben az enzim-szubsztrát komplex enzimmé és szubsztráttá történő átalakulása a sebességmeghatározó folyamat, $k_{-1} \gg k_2$, és $\frac{k_{kat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1}}$. Ez utóbbi esetben tehát az enantioszelektivitást egy összetettebb összefüggés írja le.

Az enantioszelektivitást leíró összefüggés kifejezésére Chen és munkatársai az enzimkatalitikus reakciók reverzibilitását vették alapul. Hidrolízis és észterezési reakciókat tanulmányozva olyan összefüggéseket vezettek le, amely segítségével a királis szubsztrát vagy a termék koncentrációinak ismeretében az enantiomer arány meghatározható (Chen, 1982).

Irreverzibilis reakcióra, ahol A enantiomer P termékké (gyors reakció), B enantiomer pedig Q termékké (lassú reakció) alakul,

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]}, \quad \text{E-1.2.}$$

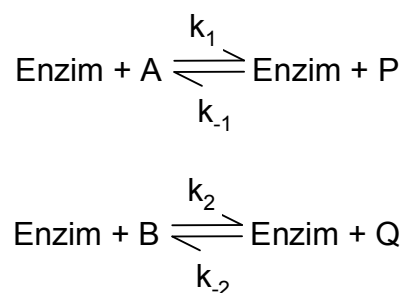
ahol c a konverzió és $c = 1 - \frac{A+B}{A_0+B_0}$,

ee_s a szubsztrátumra vonatkoztatott enantiomer felesleg és $ee_s = \frac{B-A}{A+B}$,

ee_p a termékre vonatkoztatott enantiomer felesleg és $ee_p = \frac{P-Q}{P+Q}$.

A fenti összefüggések jól leírják pl. a racém treo-metil-2,4-dimetil-3-hidroxipent-4-enoát vizes közegben lejátszódó hidrolízisét pankreász lipáz enzimmal, és más hidrolitikus rezolválási reakciókat is [Chen, 1982].

A vizes közegű hidrolízissel ellentétben a vízzel nem elegyedő szerves oldószerben kis mennyiségű víz jelenléte mellett lejátszódó kondenzációs reakciók (pl. észterezés, átészterezés) **reverzibilis reakciók**. Feleslegben lévő ($>10 K_m$) acil donor vagy acil akceptor alkalmazása esetén a racém szubsztrát reakciója sematikusán a következőképpen írható le [Chen, 1986]:



ahol k_1 és k_2 , valamint k_{-1} és k_{-2} a látszólagos pszeudo elsőrendű sebességi konstansok (V_{\max}/K_m). Egyensúlyi állapotban írható, hogy

$$\begin{array}{l} [A] \cdot k_1 = [P] \cdot k_{-1} \text{ és} \\ [B] \cdot k_2 = [Q] \cdot k_{-2} \end{array}$$

Mivel az enzim nem változtatja meg a két enantiomer reakciójának egyensúlyi állandóját, hanem csupán az egyensúly elérését gyorsíthatja fel, szerves oldószerben az egyensúlyi állandó:

$$K = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{k_{-2}}{k_2} = \frac{[A]}{[P]} = \frac{[B]}{[Q]}$$

Az egyensúlyi állandó gyakorlati meghatározásához hagyják, hogy a gyorsan reagáló szubsztrátból képződő termék elérje az egyensúlyi koncentrációját. Az egyensúlyi állandó ekkor megbecsülhető a gyorsan reagáló szubsztrátból képződő termék egyensúlyi koncentrációjának és a visszamaradó gyorsan reagáló szubsztrát koncentrációjának

ismeretében. A és B enantiomerek fogyását leíró differenciálegyenlet megoldásából az egyensúlyi állandó segítségével kifejezhető a reverzibilis reakciók enantioszelektivitását leíró összefüggés:

$$E = \frac{\ln[1 - (1 + K) \cdot (c + ee_s \cdot (1 - c))]}{\ln[1 - (1 + K) \cdot (c - ee_s \cdot (1 - c))]} = \frac{\ln[1 - (1 + K) \cdot c \cdot (1 + ee_p)]}{\ln[1 - (1 + K) \cdot c \cdot (1 - ee_p)]} \quad \text{E-1.3.}$$

A reakció elején a gyorsan reagáló enantiomer koncentrációja gyorsan változik mindaddig, amíg eléri az egyensúlyi koncentrációját. Magas enantioszelektivitás esetén a lassan reagáló enantiomer koncentrációja ekkor még alig változott. Amint a gyorsan reagáló enantiomer elérte az egyensúlyt, a lassan reagáló enantiomer koncentrációváltozásának hatására az enantiomer felesleg elkezd csökkenni. Ebből következően magas enantioszelektivitás eléréséhez a reakciót akkor célszerű megállítani, amikor a gyorsan reagáló enantiomer eléri az egyensúlyi koncentrációját.

Racém elegy kinetikai rezolválásakor az enantiomer arány meghatározásához a konverzió, a szubsztrát vagy a termék enantiomer feleslege illetve az idő közül kettő ismerete szükséges. Ezen kísérleti adatok ismeretében nem-lineáris regresszióval az E-t leíró összefüggés illeszthető az adatpontokra. Ilyen célból a numerikus integrálás során a Runge-Kutta, a regresszió során pedig a Marquardt módszer alkalmazása ajánlott [Straathof, 1997].

Chen és munkatársai számos szerves közegű észterezési reakcióban tesztelték a reverzibilis reakciók enantioszelektivitását leíró összefüggés helyességét [Chen, 1986]. Vizsgálták akirális acil donor (hexánsav, laurilsav, fenil-valeriánsav) és királis acil akceptor (*dl*-mentol), valamint királis acil donor ((*R,S*)-2-p-klór-fenoxi-propionsav) és akirális acil akceptorok (butanol, ciklohexanol) *Candida rugosa* lipázzal katalizált észterezési reakcióit. A kísérleti konverzió-enantiomerfelesleg adatpontokra jól illeszkedtek az E-1.3. összefüggés segítségével generált értékek. Az acil donorok és acil akceptorok eltérő szerkezetéből adódóan a reakciók egyensúlyi állandói egy nagyságrendbeli eltérést mutattak.

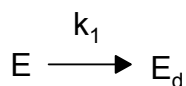
1.1.2.3. Az enzimek stabilitása, dezaktiválódás

Az enzimek közös tulajdonsága, hogy aktivitásuk az időben csökken. Azt az időt, amely megmutatja, hogy mennyi idő alatt csökken aktivitásuk a felére, felezési időnek nevezzük, és ezzel jellemezzük az enzimek stabilitását. Az enzimek aktivitásának csökkenését vagyis dezaktiválódását leggyakrabban a környezet optimálistól eltérő hőmérséklete, pH-ja, ionerőssége, víztartalma és/vagy nyomása idézi elő [Faber, 1992; Gacesa, 2002, Buchholz, 2005].

Egy enzim termikus inaktivációja során különböző kémiai folyamatok mennek végbe, úgymint aggregáció, disszociáció, szerkezetváltozás okozta denaturáció, stb. [Mozaev, 1982]. Az egyik legismertebb hipotézis enzimek inaktivációjára a Lumry-Eyring mechanizmus, $N \rightleftharpoons D \rightarrow I$, ahol az enzim natív (N) formája először reverzibilisen denaturálódik (D), majd irreverzibilis változáson megy keresztül és kialakul az inaktív (I) forma [Lumry, 1954]. A későbbiekben jó néhány komplex mechanizmus teória látott napvilágot, amelyek számos egymást követő unimolekuláris lépésen keresztül vezetnek el az aktívból az inaktív formába [Henley, 1984]. Ezek a mechanizmusok kémiailag nem feltétlen korrektek, de lehetővé teszik az inaktivációs adatok elemzését, modellezését.

A tárolási stabilitás meghatározásához az enzimet szubsztrát(ok) nélkül a vizsgálni kívánt paraméterek között adott ideig inkubálják, majd meghatározzák az aktivitásának változását az időben. A működési stabilitást ezzel szemben reakció közben határozzák meg, és mivel a vizsgálni kívánt paramétert, (pl. vízaktivitás, szubsztrát koncentráció, termékek koncentrációja) állandó értéken kell tartani a reakció teljes ideje alatt, a működési stabilitás vizsgálata jóval bonyolultabb, mint a tárolási stabilitásé.

A felezési idő meghatározásához a dezaktiválódás kinetikájának ismerete szükséges, amelynek leírására két modellt alkalmaznak leggyakrabban (Henley, 1984; Henley, 1985). Az ún. elsőrendű modell azokra az esetekre alkalmazható, amikor az enzim egy lépésben a teljes aktivitását elveszíti.



Ekkor az enzim aktivitásának csökkenését az E-1.4. egyenlet írja le:

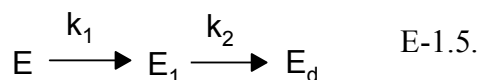
$$-\frac{dE}{dt} = k_1 \cdot E, \quad \text{E-1.4.}$$

ahol k_1 az elsőrendű dezaktivációs konstans, E pedig az eredeti enzimet jelöli.

Tekintve, hogy az enzimek szerkezete igen bonyolult, ez a kinetika sok esetben nem alkalmas az enzimek dezaktiválódásának korrekt leírására. Az enzimmolekuláknak lehetnek „dezaktiválódásra érzékeny” részei, amelyek elsőként reagálnak a környezeti tényezőkre. A S-S diszulfidhidak, valamint a S-H kötések pl. jelentős szerepet játszanak több enzim dezaktiválódásában [Mozaev, 1982]. A két lépésben történő dezaktiválódási modell lehetőséget ad arra, hogy figyelembe vegyük az enzim aktivitásának változását az időben, illetve, hogy megkülönböztessük az enzim szerkezetében konszekutív módon bekövetkező változásokat, amelyek pl. a gomba tirozináz enzim esetében okozhatják első lépésben az

enzim aktivitásának átmeneti növekedését [Letts, 1974], mielőtt az elveszíti a második lépésben a teljes aktivitását.

Az ún. soros dezaktivációs modell szerint az enzim (E) az első lépésben bekövetkező aktivitás változás eredményeképpen E_1 enzimmé alakul, majd a következő lépésben elveszíti aktivitását, és E_d inaktív enzim keletkezik (E-1.5.).



ahol k_1 és k_2 elsőrendű dezaktiválódási sebességi állandók.

Az enzim aktivitásának elvesztése az E-1.3. és E-1.6. egyenletekkel fejezhető ki.

$$-\frac{dE_1}{dt} = k_2 \cdot E_1 - k_1 \cdot E \quad \text{E-1.6.}$$

Az E-1.3. egyenlet integrálásából kapott egyenletet E-1.6.-ba helyettesítve kapjuk, hogy

$$-\frac{dE_1}{dt} = k_2 \cdot E_1 - k_1 \cdot E_0 \cdot \exp(-k_1 \cdot t), \quad \text{E-1.7.}$$

ahol t az idő, E_0 pedig a $t=0$ időpontban az enzim aktivitása.

Általában az enzim aktivitásának változását leíró egyenlet megalkotása a cél, ezért további átalakítások szükségesek. Ezek részleteiben megtalálhatók Henley és Sadana ezzel foglalkozó cikkeiben [Henley, 1984; Henley, 1985], ezért itt a levezetést nem mutatom be.

E és E_1 enzimek aktivitásának segítségével megkapható bármely időpillanatban az enzim aktivitása (E-1.8. egyenlet):

$$a = \left[1 + \frac{\alpha \cdot k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) - \frac{k_1 \cdot \alpha}{k_2 - k_1} \cdot \exp(-k_2 \cdot t), \quad \text{E-1.8.}$$

ahol

a : az enzim aktivitása t időpillanatban,

α : E_1 és E specifikus aktivitások aránya (E_1/E).

Az egyenlet diszkussziójaként három eset különböztethető meg:

- Amennyiben $\alpha=0$, vagyis az E_1 enziforma aktivitása nulla, eljutunk a klasszikus elsőrendű dezaktivációs egyenlethez;
- $\alpha<1$ esetén az enzim folyamatosan veszít aktivitásából. Ez a leggyakrabban előforduló eset;
- $\alpha>1$ esetén az enzim aktivitása először átmenetileg nő, majd csökken, míg elveszíti aktivitását.

Az enzim stabilitásának jellemzésére szolgáló felezési idő meghatározásához az E-1.8. egyenletbe $a = \frac{a_0}{2}$ helyettesítést szükséges elvégezni (E-1.9. egyenlet).

$$a_{1/2} = \left[1 + \frac{\alpha \cdot k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot \exp\left(-k_1 \cdot t_{1/2}\right) - \frac{k_1 \cdot \alpha}{k_2 - k_1} \cdot \exp\left(-k_2 \cdot t_{1/2}\right) \quad \text{E-1.9.}$$

A dupla-exponenciális, vagy más néven soros típusú dezaktivációs kinetikával jól leírható pl. a *Candida antarctica* lipáz B enzim [Arroyo, 1999] és a kovalensen immobilizált *Candida rugosa* lipáz A és B tisztított enzimek aktivitásának csökkenése 50 °C-on [Moreno, 1997].

Az enzimek stabilitása alapvetően megszabja alkalmazhatóságukat. A dezaktivációs kinetika információt adhat az enzim szerkezetében különböző tényezők hatására bekövetkező változásokról, és enzimeket alkalmazó diagnosztikai módszerek kidolgozásánál is nélkülözhetetlen.

1.2. Az enzimműködést befolyásoló legfontosabb paraméterek

Az enzimek viselkedése függ a hőmérséklettől, a nyomástól valamint azon paraméterektől, amelyek befolyásolják az enzim ionizációs állapotán keresztül a molekulán belüli másodlagos kötőerőket, amelyek stabilizálják az enzimmolekula katalitikusan aktív konformációját. Vizes környezetben ezek a paraméterek a pH és az ionerősség. Szerves oldószerekben a pH nem fejezhető ki, csupán az ionerősség és az oldószer hidrofóbicitásának értelmezésére van mód. Az oldószeres hidrofób/hidrofil jellegének jellemzésére a leggyakrabban a log P értéket, a dielektromos állandót, a dipólusmomentumot és a Hildebrandt oldhatósági paramétert szokás használni. Ezeken kívül az enzimmolekulán belüli másodlagos kötőerőket még egy rendkívül fontos tényező befolyásolja szerves oldószerben, ez pedig a reakcióelegyben jelenlévő víz mennyisége [Buchholz, 2005; Illanes, 2008].

A mezofil enzimek a természetben semleges körüli pH értéken és az élő szervezet hőmérsékletén, 37-40 °C-on fejtenek ki maximális katalitikus aktivitást. Savas vagy lúgos környezetbe helyezve az enzimeket sérülhet natív konformációjuk, melynek eredményeképpen stabilitásuk és aktivitásuk csökken.

Vizes környezetből szerves oldószerbe helyezve a fehérjemolekulákat, töltéssel rendelkező csoportjaik ionizációs állapota nem változik. Ezért, ha az enzimek liofilizálása pH-optimumuknak megfelelő puffer oldatból történik, szerves oldószerben is megfelelő ionizációs állapotúak maradnak. A fehérjék ezen tulajdonságát pH-emlékezetnek nevezi a szakirodalom [Costantino, 1997].

Az enzimkatalitikus reakciók sebességét a hőmérséklet függvényében vizsgálva azt tapasztaljuk, hogy a reakció sebessége eleinte exponenciálisan növekszik a hőmérséklettel, majd egy adott hőmérsékleten túl hirtelen csökken. A reakciósebességet a hőmérséklet függvényében leíró optimumgörbe fel- és leszálló ága két különböző esetet tükröz. Kezdetben a reakció sebessége az Arrhenius-egyenlet értelmében mindaddig növekszik, amíg elérjük az enzim hőmérsékleti optimumát. Ennél magasabb hőmérsékleten az enzim molekulán belüli molekulamozgások oly mértékben megnövekednek, hogy a natív konformáció sérülése miatt az enzim dezaktiválódik. Az enzimek *in vitro* pH- és hőmérsékleti optima eltérhet az *in vivo* optimumoktól.

1.3. Az enzimkatalizátorok módosításának lehetőségei

Az enzimek szerkezete és a működésük közötti kapcsolat kutatása révén már számos enzimtulajdonság szerkezeti vonatkozása ismeretes. Ahhoz, hogy egy-egy előnyös tulajdonságot (pl. extrémofil enzimek jó tűrőképességét) más enzimek katalízisében is kamatoztatni lehessen, az eredeti enzim szerkezetének módosítása szükséges. Ennek a következő módjai lehetnek:

1. Fehérjemérnökség (protein engineering v. genetic engineering);
2. Oldószermérnökség (solvent vagy medium engineering);
3. Enzimek kémiai módosítása.

A fehérjemérnökség alapvetően különbözik a többi módszertől, hiszen az enzimek aminosav-összetételében hoz létre változásokat a biotechnológia eszközeivel. Ezzel szemben az enzimek kémiai módosítása csak az enzim molekula felületén elhelyezkedő aminosav oldalláncokat módosítja, az oldószermérnökség eszközeivel pedig csupán az enzim molekula konformációjának változása érhető el [Buchholz, 2005; Illanes, 2008].

1.3.1. Fehérjemérnökség

Mivel az enzimek termelése a DNS-ben kódolt módon történik, a termelt enzim szerkezetének megváltoztatásához mindenképpen az enzimtermelésre használt gazdaélőlény DNS-ét szükséges módosítani. Javított tulajdonságú enzim két módon nyerhető.

A *racionális tervezés* (rational design) lényege, hogy a termelni kívánt enzim molekulának megfelelő génszakaszt izolálják, bejuttatják a gazdasejtbe és elszaporítják, majd a gazdasejt szaporítása útján arra kényszerítik, hogy saját enzimjeinek termelésével egyidejűleg az „idegen” enzimet is termelje. Gazdasejtnak mikrobiális szervezetek (pl. baktériumok, élesztőgombák) használhatók előnyösen, hiszen ezek gyorsan kettőződnek,

miközben a sejt felépítéséhez szükséges összes fehérjét (enzimet) szintetizálják. A módszer alkalmazásához a „beültetni kívánt” előnyös enzimtulajdonságot kódoló aminosav szekvencia és térszerkezet pontos ismerete szükséges.

Ezt a hátrányt küszöböli ki az *irányított evolúció* (directed evolution), amely a fehérjemolekulában való véletlenszerű mutációk létrehozására épül. A módszer alkalmazása akkor előnyös, amikor az adott katalitikus feladatnak megfelelő enzimtulajdonság, vagyis enzimszerkezet nem ismert. Az irányított evolúció ismeretlen tulajdonságú enzimeket hoz létre, amelyeket tesztelni kell, majd pedig kiválasztani közülük az adott célnak megfelelő enzimet (screening). Az így kapott enzim előnyös tulajdonsága véletlenszerű mutációval vagy racionális tervezéssel tovább fokozható.

1.3.2. Oldószermérnökség

Az oldószermérnökség alapja az a felismerés, miszerint az enzim molekulák konformációja, ezen keresztül pedig a katalitikus tulajdonságaik jelentősen függenek környezetük fizikai-kémiai tulajdonságaitól.

Az enzimkatalitikus reakciók a reakcióközeg alapján két csoportra oszthatók. A konvencionális közegű reakciók azok, amelyek az enzimek természetbeni (*in vivo*) működéséhez hasonlóan vizes közegben játszódnak le. Az ettől eltérő közegben végzett reakciókat összefoglaló néven nem konvencionális közegű reakcióknak nevezzük. A legfontosabb nem konvencionális közegek a

- szerves oldószerek,
- szuperkritikus fluidumok,
- ionos folyadék,
- szilárd fázisú reakciók.

A legkiterjedtebb szakirodalommal kétségkívül a szerves oldószerekben végzett enzimkatalitikus reakciók rendelkeznek.

1.3.3. Enzimek kémiai módosítása

Habár a fehérjemérnökség hatékony módszer az enzimek szerkezetének és funkciójának újratervezésében, ennek a módszernek a határt szab a 20 tipikusan használt esszenciális aminosav alkalmazása. A kémiai módosítás ezt a határt lépi át, mivel mintegy százféle poszttranszlációs kémiai módosítási eljárás ismert. Ezzel a lehetőségek szinte végtelen száma jön létre, amelyekkel különböző funkciós csoportokat ültethetünk be enzim molekulákba, bár a

módosításhoz alkalmazott reakciók nem jellemzőek a természetben. A leggyakoribb módosítási reakciók a következők:

- acilezés (általában acetilezés, az N-terminális végen),
- alkilezés (általában Lys és Arg metilezése, demetilezés),
- amidkötés (C-terminális végen vagy keresztkötés Asn/Gln és Lys közt), stb.

A kémiai módosításoknak három ágát különböztetjük meg: (1) nem specifikus kémiai módosítás, (2) oldalspecifikus kémiai módosítás és (3) oldalszelektív kémiai módosítás irányított mutagenézissel kapcsolva. Mind a fehérjemérnökség, mind a kémiai módosítási eljárások alapját a pontos szerkezetmeghatározási módszerek képezik. Az ilyen technikákban bekövetkező folyamatos fejlődések miatt az enzimmodosítási eljárások előtt ígéretes jövő áll [Davis, 2003].

1.4. Nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciók

Az enzimeket biokatalizátorokként eleinte kizárólag olyan reakciók katalizálására alkalmazták, amelyekben az oldószer víz volt. Később bebizonyosodott, hogy katalitikus aktivitásukat szerves oldószerekben és más közegekben is megőrzik, és ez a felismerés a szerves kémikusok számára új lehetőségeket teremtett. A szerves oldószerek alkalmazásának előnyeit és hátrányait az 1.1. táblázatban foglaltam össze.

1.1. táblázat: A szerves oldószerekben lejátszódó enzimkatalitikus reakciók előnyei és hátrányai.

ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
A szerves szubsztrátumok jobban oldódnak szerves oldószerben, mint vízben.	Csökkenhet a reakciósebesség a szerves oldószerben.
Megváltozhat az enzim specifikussága.	A víz aktivitás szabályozására lehet szükség.
A kémiai egyensúly befolyásolható, kedvező irányba tolható el.	Kétfázisú rendszerekben felületi inaktiválódás léphet fel.
Megnőhet az enzimek termikus stabilitása.	A szerves oldószerek gyúlékonyak, alacsony a forráspontjuk.
Csökken a mikrobiális elszennyeződés veszélye.	A szerves oldószerek denaturálhatják az enzimeket.

A nem hagyományos közegű enzimkatalitikus reakciók rendszerezésére számos próbálkozás volt, közülük legjelentősebb Davison és munkatársai összegzése [Davison, 1997].

Azokat a biokatalitikus folyamatokat, amelyekben egyetlen nagy vizes fázis van jelen, és ebben oldott állapotban található a katalizátor, a szubsztrátok és a termékek, konvencionális rendszereknek nevezik. Az összes többi - biokatalizátort alkalmazó – rendszer a nem konvencionális folyamatok közé sorolható. Ezen belül további megkülönböztetés tehető aszerint, hogy mekkora vizes fázist tartalmaz a nem konvencionális reakcióelegy, ami meghatározza pl., hogy a katalizátor oldott vagy oldatlan formában van jelen. E szerint a nem vizes közegű biokatalitikus folyamatok közé azok tartoznak, amelyekben a vizes fázis igen csekély hányadát képezi a teljes reakcióelegynek, vagy teljesen hiányzik. A nem hagyományos vizes közegű reakciók csoportját olyan folyamatok alkotják, amelyekben a vizes fázis aránya jelentős, és a katalizátor oldott formában van jelen. Olyan eset is lehetséges, hogy két, egymással nem elegyedő vizes fázisból áll a reakcióelegy, vagy a vizes fázisok membrán által szeparáltak. A nem konvencionális biokatalitikus folyamatok reakcióközege felosztásuk szerint lehet

1. szerves oldószer,
2. szuperkritikus fluidum,
3. gáz/gőz fázis.

A csoportosítás nem tartalmazza, de fontos megemlíteni két további nem-konvencionális rendszert, a fordított micellákat [Otero, 1995; Lee, 1998] és az oldószermentes reakciókat [Han, 1998]. Az osztályozás természetesen még nem vehette figyelembe az ionos folyadékokat.

1.4.1. Nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciók szerves oldószerekben

A természetben a hidroláz enzimek vizes környezetben különböző kötések (peptid, észter) hidrolízisét katalizálják. Az ellentétes reakció katalizálását, amelyben ezek a kötések kialakulnak, vagyis a szintézisreakciókat más enzimek végzik. A lipázok pl. észterből vizes oldatban a megfelelő szerves savat és alkoholt teszik szabaddá. Ezzel szemben nem-konvencionális közegben a lipázok szerves savból és alkoholból észter szintézisére képesek, vagyis ugyanazon enzim segítségével a reakcióközeg megválasztásától függően ellentétes reakciók katalizálhatók [Vulfson, 2001; Carrea, 2008].

1.4.1.1. A szerves reakcióközeg és annak víztartalmának hatása az enzimekre

Az enzimek aktivitásának megtartásához enzimenként eltérő mennyiségű víz jelenléte szükséges az enzim molekula környezetében (unbound water). Az α -kimotripszin számára pl. ~50 vízmolekula már biztosítja a katalitikusan aktív konformációt [Zaks, 1986]. Ez pedig

jóval kevesebb annál, amennyi kellene az enzimmolekula körül egy vízmolekula réteg kialakításához. Ezzel szemben pl. a polifenol-oxidáz enzim kb. 3.5×10^7 vízmolekulát igényel [Kazandijan, 1985].

A szerves reakcióközeg víztartalma a gőz-fázis egyensúlynak megfelelően megoszlik a reakcióelegy egyes részei között. Kötődik az enzimhez, immobilizált enzim esetén a hordozóhoz, más része a szerves oldószerben oldódik illetve a reakcióelegy feletti gőztérben található.

Ahhoz, hogy egy enzim működését össze lehessen hasonlítani a különböző típusú oldószerekben, fontos, hogy az enzim ezekben azonos hidratáltsági állapotban legyen jelen. Ezt a termodinamikai vízaktivitás írja le legjobban. A fázisegyensúlynak megfelelően a vízaktivitás a reakcióedényben mindenhol azonos. A vízaktivitás a reakcióelegy gőztérében *in situ* mérhető, és definíciószerűen azonos a víz parciális nyomásának és a telített vízgőz nyomásának hányadosával adott hőmérsékleten. A vízaktivitás 0 és 1 között változhat. Az 1990-es évek közepéig a vízaktivitás helyett többnyire a reakcióelegy víztartalmát használták a szerves oldószerek reakcióközegként való összehasonlításakor. Figyelembe kell azonban venni, hogy az oldószerek – hidrofóbicitásuktól függően - eltérő mennyiségű vizet vonnak el az enzim környezetéből. Ennek következtében azonos mennyiségű vizet helyezve pl. n-hexánba ($\log P=3.5$) és tetrahidrofuranba ($\log P=0.5$), a n-hexánban lévő enzim környezetében több víz marad. Így az egymástól igen eltérő hidrofóbicitású oldószerből álló reakcióközegek összehasonlításakor a víztartalom nem megfelelő paraméter.

Mivel az enzimek aktivitása a hidratáltsági állapotuktól függ, enzimkatalitikus reakciókban gondoskodni kell a reakcióelegy vízaktivitásának beállításáról. A reakció vízaktivitása a szubsztrátok, a termékek és az oldószer polaritásától, hidrofíl jellegétől, valamint a szubsztrátok és a termékek koncentrációjától függően folyamatosan változik a reakció előrehaladtával. Amennyiben a szubsztrátok koncentrációja a reakcióelegyben alacsony, és a reakcióban víz sem szubsztrátként, sem termékként nem szerepel, ez a vízaktivitás változás elhanyagolható. Ekkor elegendő a vízaktivitást a reakció indítása előtt beállítani. Ellenkező esetben, mint pl. észterezési reakciók során, folyamatos vízaktivitás kontroll szükséges a vízaktivitás állandó értéken tartására.

1.4.1.2. Kezdeti vízaktivitás beállítása telített sóoldatokkal

A kezdeti vízaktivitás beállítására legelterjedtebben ismert vízaktivitású telített sóoldatokat használnak laboratóriumi körülmények között. A leggyakrabban alkalmazott telített sóoldatok vízaktivitásait [Greenspan, 1977] az 1.2. táblázat mutatja be:

1.2. táblázat: Telített sóoldatok vízaktivitása 25 °C-on.

TELÍTETT SÓOLDAT	VÍZAKTIVITÁS, -	TELÍTETT SÓOLDAT	VÍZAKTIVITÁS, -
LiCl	0.113	KI	0.689
KAc	0.225	NaCl	0.753
MgCl ₂	0.328	KCl	0.843
K ₂ CO ₃	0.432	KNO ₃	0.936
Mg(NO ₃) ₂	0.529	K ₂ SO ₄	0.973
NaBr	0.576		

A legalacsonyabb érték, amit telített sóoldatokkal el lehet érni, a 0.05 körüli vízaktivitás. Ennél alacsonyabb vízaktivitás eléréséhez már molekulaszűrők vagy más szárító anyagok szükségesek.

1.4.1.3. Vízaktivitás beállítás gőztéren keresztül

A gőztéren keresztüli vízaktivitás beállításhoz a telített sóoldatot egy jól zárt edénybe helyezik, és ebbe teszik egy másik főzőpohárban a mintát (enzimkészítmény, oldószer, stb.), amelynek a vízaktivitását beállítani kívánják. A telített sóoldat készítéséhez a sóhoz csupán annyi vizet adnak, hogy a víz éppen átnedvesítse a sót. Az oldatlan sókristályoknak köszönhetően megnő a fázisérintkezési felület, amelynek eredményeképpen a fázisegyensúly gyorsabban létrejöhét [Vulfson, 2001].

Ismert vízaktivitású reakcióelegy összeállításához ideálisan a reakcióelegy egészét kellene ismert vízaktivításra hozni. Természetesen ahhoz, hogy a reakció a kívánt időpontban legyen indítható, valamely szubsztrátot vagy az enzim katalizátort mégis a reakcióelegytől külön kell az adott vízaktivításra hozni. Legtöbbször a biokatalizátort szeparálják el a reakcióelegytől, mert a reakcióelegyben ennek a legkisebb koncentrációja, ezért a vízaktivitás beállítást követően reakcióelegyhez adva így a legkisebb a reakcióelegy két részének elegyítéséből származó vízaktivitás változás. A másik lehetőség, hogy a reakcióelegyben legkisebb koncentrációban jelenlévő szubsztrát vízaktivitását állítják be a reakcióelegytől elkülönítve.

1.4.1.4. Vízaktivitás beállítás membránon keresztül telített sóoldatokkal

Ez a módszer - az előzővel ellentétben - folyamatos vízaktivitás beállítást tesz lehetővé. Ehhez a reakcióelegyet és a telített sóoldatot két különálló üvegedénybe helyezik. Az enzimmkatalizátort hordozóhoz rögzítve, immobilizált formában adják a reakcióelegyhez. A másik üvegedénybe helyezik a telített sóoldatot, mely ebben az esetben nagy tömegű sóoldatot jelent az alján oldatlan sókristályokkal. A két üvegedényt szilikon csőmembránnal kötik össze, amely a vízre permeábilis, azonban nem lép kölcsönhatásba a rendszer többi részével. Perisztaltikus pumpa segítségével a csőben folyamatosan áramoltatják a telített sóoldatot. A reakcióelegy és a telített sóoldat vízaktivitása közötti különbség hajtóerőt jelent, melynek hatására víztranszport indul meg a telített sóoldat és a reakcióelegy között. Ennek sebessége a telített sóoldat áramlási sebességének és a reakcióelegybe merülő csőmembrán hosszának növelésén keresztül fokozható [Vulfson, 2001].

1.4.1.5. Vízaktivitás beállítás sóhidrátpárokkal

A reakcióelegy vízaktivitásának folyamatos *in situ* beállítására sóhidrátpárok is alkalmazhatók [Vulfson, 2001]. A módszer azon a tényen alapul, hogy egy stabil kristályvizes só egyensúlyban van annak vízmentes formájával. Ezért, ha egy rendszer tartalmazza az egyensúlynak megfelelő mennyiségben mindkét sót, a rendszerben a vízaktivitás beáll egy adott értékre. Attól függően, hogy hány kristályvizes sók állnak így egyensúlyban, más-más vízaktivitás érhető el. A $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ és Na_2SO_4 vízmentes pl. 20 °C-on 0.76-os vízaktivitást állít be. Más megfogalmazásban, ha egy $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ és vízmentes Na_2SO_4 sókat tartalmazó rendszer vízaktivitása 20 °C-on 0.76, a sók egyensúlyban vannak (1.3. táblázat).

1.3. táblázat: Sóhidrátpárok vízaktivitása 20 °C-on.

A Na_2SO_4 (10/0) jelölés $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ és vízmentes Na_2SO_4 sókeverékre utal.

SÓHIDRÁTPÁR	VÍZAKTIVITÁS (A_w)	SÓHIDRÁTPÁR	VÍZAKTIVITÁS (A_w)
Na_2SO_4 (10/0)	0.76	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (10/0)	0.60
LiSO_4 (1/0)	0.12	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (10/5)	0.80
NaI (2/0)	0.17	Na_2HPO_4 (12/7)	0.74
BaBr_2 (2/0)	0.26	Na_2HPO_4 (7/2)	0.57
NaOOCH_3 (3/0)	0.37	Na_2HPO_4 (2/0)	0.15

A sóhidrátpárok kiválasztásánál fontos szempont, hogy a só ne képezzen só-vegyületet a szubsztráttal, gyors vízfelvevő/vízleadó tulajdonsággal rendelkezzen, és az általa beállított vízaktivitás ne legyen függvénye annak, hogy milyen összetételben tartalmazza a keverék a két különböző hidrátformát. Elméletileg átmeneti fémsók is alkalmasak lehetnének vízaktivitás pufferelésére, azonban ezek nem mutatnak ideális viselkedést, illetve dezaktiválják az enzimeket. Ez a probléma elkerülhető, ha a sópárokat a reakcióelegytől elkülönítve, a zárt reaktor gázterébe helyezzük [Han, 1998)].

Olyan reakciókban, ahol a víz szubsztrátként vagy termékként vesz részt a reakcióban, a reakció előrehaladtával viszonylag nagy mennyiségű víz leadására vagy eltávolítására lehet szükség. Ezért a reakcióelegynek mindkét sóhidrátot feleslegben kell tartalmaznia. Célszerű azt feltételezni, hogy az oldószer nem képes vizet felvenni a reakcióelegyből, tehát pl. egy észterezés során keletkezett víz teljes mennyiségét a vízmentes sónak kell felvenni. Ismerve, hogy mennyi a só vízmegkötő képessége, a szükséges vízmentes só mennyisége egyszerűen kiszámolható.

1.4.1.6. Vízaktivitás beállítás pervaporációval

A pervaporáció membránszeparációs művelet, amely egy szelektíven permeábilis, nem porózus szerkezetű membránt alkalmaz. A betáplált folyadékáram bizonyos komponense a membrán két oldala közötti kémiai potenciálkülönbség hatására elgőzölög, és áthatol a membránon [Mulder, 1996].

A pervaporációval történő vízaktivitás beállítást megelőzően szükséges a reakcióelegy vízaktivitásának mérése lehetőleg minél több víztartalom mellett. Az így kapott vízadszorpciós izoterma alapján nyomon követhető, hogy az észterezés során keletkező víz következtében megemelkedett víztartalom milyen mértékű változást okoz a vízaktivításban. Ehhez a reakcióelegy víztartalmát folyamatosan mérik, majd amikor a víztartalom okozta vízaktivitás növekedés elér egy értéket, a reakcióelegyet bevezetik a pervaporációs membránmodulba. A reakcióelegyet addig áramoltatják át a modulon, amíg a víztartalma olyan értékre nem csökken le, amely megfelel a kívánt vízaktivitásnak. A reakcióelegy vízaktivitása így kvázi állandó értékre állítható be [van der Padt, 1993].

1.4.1.7. Az oldószer hatása az enzimek aktivitására és szelektivitására

A vízaktivitással ellentétben arra vonatkozó általános szabály, hogy a szerves oldószerek milyen hatással vannak az enzimek működésére, nem ismeretes. Egy-egy enzim kapcsán felfedezhetők összefüggések az enzim katalitikus tulajdonságai és a szerves

oldószer fizikai-kémiai tulajdonságai között, azonban ezek a relációk sokszor nem bizonyulnak igaznak más enzimek működésére.

A szerves oldószer enzimműködést befolyásoló legfontosabb fizikai-kémiai tulajdonságai:

- dielektromos állandó;
- dipólusmomentum;
- $\log P$;
- Hildebrand oldhatósági paraméter.

Mind a négy paraméter az oldószer polaritásával, polarizálhatóságával kapcsolatos. A $\log P$ az adott oldószer megoszlási hányadosainak logaritmusát n -oktán-víz kétfázisú rendszerben. A Hildebrand oldhatósági paraméter az oldószermolekulán belüli van der Waals kölcsönhatások erősségére utal. A nagy dipólusmomentummal és magas dielektromos állandóval rendelkező oldószer poláris karakterűek, míg a kis dipólusmomentummal és alacsony dielektromos állandóval rendelkezők apoláris oldószer. Az 1.1. ábrán bemutatjuk egy *Pseudomonas capacia* lipáz katalizálta reakció konverziójának függését a Reichardt-féle polaritástól [Reichardt, 2003]. (A Reichardt-féle polaritási skálán a trimetil-szilán polaritása 0, a vízé pedig 1). Megfigyelhető, hogy a reakciót különböző polaritású oldószerben végezve a konverzió a polaritás függvényében csökkent, majd az ionos folyadékok belépésével meredeken nőtt. 0.6 – 0.8 közé eső polaritású ionos folyadékokban magas konverziót értek el, míg az ugyanilyen polaritású N-metil-formamidban egyáltalán nem ment végbe a reakció.



1.1. ábra: A konverzió függése a Reichardt-féle polaritástól [Park, 2003].

A *Pseudomonas cepacia* lipáz enzim működését királis alkoholok észterezése és átészterezése során tanulmányozták [Cernia, 1998; Catoni, 1995]. Az enantioszelektivitást az enantiomerfelesleggel jellemezték, azonban nem közölték, hogy a cikkben bemutatott az enantiomerfelesleg értékek milyen konverzió mellett születtek az észterezési reakciókban. A fenil-etanol és vinil-acetát átészterezési reakciójában a konverzió az oldószer log P értékével egyenes arányosságot mutatott. Ciklohexánban és szén-tetrakloridban mintegy négyszeres reakciósebességet tapasztaltak a dioxánban, acetonban vagy a tetrahidrofuránban mérthez képest. A (\pm)-mentol vinil-acetáttal történő átészterezési reakciójában nem állapítottak meg összefüggést az oldószer log P-je és az enantiomerfelesleg között, azonban a konverzió a log P-vel egyenes, míg a Hildebrand oldhatósági paraméterrel fordított arányban állt.

A *Pseudomonas cepacia* lipáz enzim működését (*R,S*)-szulkatol és vinil-acetát átészterezésében is tanulmányozták [Nakamura, 1995]. Az enantiomer aránnyal (v_S/v_R) kifejezett enantioszelektivitás sem a log P-vel, sem a dipólusmomentummal, sem pedig a dielektromos állandóval nem mutatott összefüggést. Az (*R*)-szulkatol látszólagos Michaelis-konstansai *n*-hexánban 69 mmol/l, ciklohexánban pedig 222 mmol/l, amely arra utalhat, hogy az enzim aktív helyéhez a ciklikus oldószermolekulák könnyebben integrálódhatnak, mint a normál láncú analógjaik. Ilyen formán a szerzők feltételezték, hogy az enzim és az oldószermolekulák között enzim-oldószer komplex alakulhatott ki, amely befolyásolhatta az enzim enantioszelektivitását. Fitzpatrick és Klibanov szubtilizin Carlsberg (*Bacillus licheniformis*-ből kivont szerin proteáz) enzim enantioszelektivitását vizsgálták vízmentes szerves oldószerekben racém fenil-etanol és vinil-butirát átészterezésében [Fitzpatrick, 1991]. Az enantiomerek kezdeti reakciósebességének hányadosával (v_{0S}/v_{0R}) jellemzett enantioszelektivitás fordított arányban állt az oldószer dielektromos állandójával és dipólusmomentumával. A legmagasabb enantioszelektivitást ($v_{0S}/v_{0R}=60$) az apoláris 1,4-dioxánban és benzolban kapták, míg pl. acetonitrilben gyakorlatilag nem mutatott szelektivitást az enzim. Apoláris dioxánban az (*S*)-fenil-etanol specifikációs konstansa (k_{cat}/K_M) kétszeresére nőtt, míg az (*R*)-fenil-etanolé 10-szeresére csökkent az acetonitrilben mérthez képest. Ezek eredményeképpen a nettó enantioszelektivitásbeli változás mintegy 20-szoros. Víz hozzáadásakor (0.2 %) dioxánban csökkent az enantioszelektivitás ($v_S/v_R=18$).

A *Candida antarctica* lipáz B (Novozym 435) enzim aktivitását és enantioszelektivitását vizsgálták a vízaktivitás függvényében különböző szerves oldószerekben az (*R,S*)-2-(4-izobutil-fenil)-propionsav (ibuprofén) és 1-dodekanol észterezési

reakciójában (Ducret, 1998). A reakció fő terméke az (R)-ibuprofén-dodecil-észter volt. Az (S)-ibuprofén-dodecil-észter képződés sebessége $a_w=0.3$ -nál, az (R)-ibuprofén-dodecil-észter képződés sebessége pedig $a_w=0.04$ -nél volt maximális. Az enantioszelektivitás alacsony volt, és $a_w=0.04$ -nél volt maximális. A v_R/v_S hányados n-pentánban 5, míg n-heptánban mindössze 2.5 volt. Az enzim aktivitásának a magas log P-jű hidrofób, míg enantioszelektivitásának az alacsony log P-jű hidrophil szerves oldószerek kedveztek.

Az oldószerek hidrofób/hidrophil jellege egyes enzimek esetében még a reakció sztereospecifikusságára is hatással lehet, mint ahogyan azt *Aspergillus oryzae* proteáz enzim esetében kimutatták [Tawaki, 1992]. Számos szerves oldószerben ($\log P = -1.3 - \log P = 5.0$) vizsgálták az N-acetil-(d,l)-fenilalanin-2-klóretil észter átészterezését 1-propanollal. Az oldószerek log P-je fordított arányban állt a v_L/v_D -vel jellemzett enantioszelektivitás logaritmusával. Hidrophil oldószerekben a termék L-sztereoizomere, míg hidrofób oldószerekben a D-sztereoizomer képződött. Az enantioszelektivitás alacsony vagy moderált volt, acetonitril esetében 7.1, dimetil-formamidban 5.7, míg tetraklór-metánban 0.19.

1.4.2. Ionos folyadékok

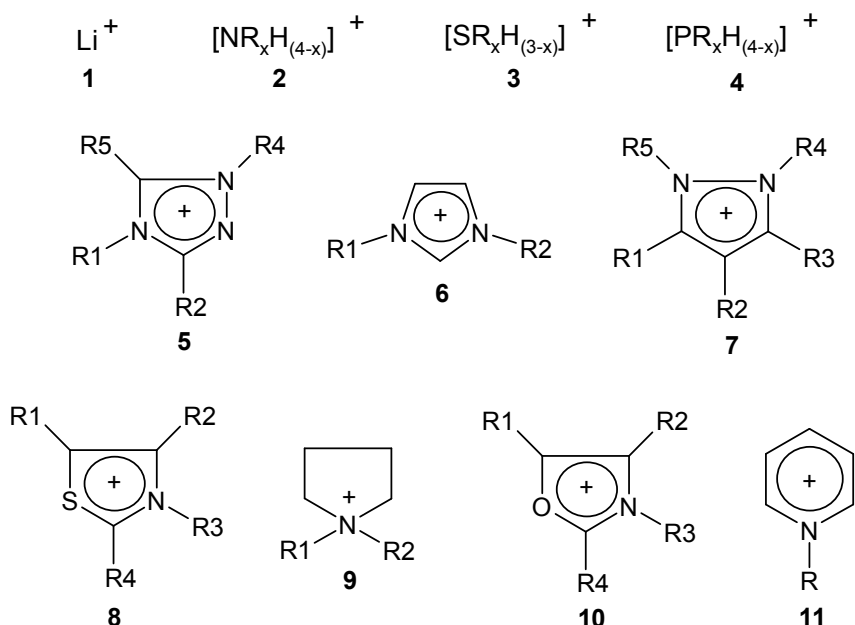
Az ionos folyadékok olyan szerves sók, amelyek csak ionokból épülnek fel, semleges molekulákat nem tartalmaznak, alacsony olvadásponttal rendelkeznek (általában kevesebb, mint 100 °C) és akár 300-400 °C-ig folyékony halmazállapotúak maradnak. Különleges jellemzőjük, hogy nem illékonyak, nem tűzveszélyesek és kiváló a termikus és kémiai stabilitásuk [Hagiwara, 2000; Yang, 2005]. Az 1.4. táblázatban a szerves oldószerek és az ionos folyadékok elemző összehasonlítását találhatjuk, alátámasztva azt a feltételezést, hogy környezetbarát alternatívát jelentenek a hagyományos szerves oldószerekkel szemben.

Az ionos folyadékokat felépítő anionok és kationok száma igen nagy, ráadásul ezek tetszőlegesen kombinálhatóak egymással, így szinte korlátlan számban állíthatók elő. Az 1.2 és 1.3. ábrákon feltüntettem néhány jellemző kation és anion típust és szubsztituálási lehetőségeiket, de korántsem az összest [van Rantwijk, 2007; Jain, 2005].

Ennek a nagyszámú variálási lehetőségnek köszönhetően az ionos folyadékok tulajdonsági megfelelően alakíthatóak, változtathatóak. Ma már arra is van lehetőség, hogy egy feladat elvégzése előtt különböző modellező szoftverek segítségével kiválasszuk egy adott feladat megoldására valószínűleg legmegfelelőbb ionos folyadékok körét [Jork, 2005].

1.4. táblázat: A szerves oldószerek és az ionos folyadékok összehasonlítása [Plechkova, 2008].

TULAJDONSÁG	Szerves oldószer	Ionos folyadék
SZÁMUK	>1000	>1000000
ALKALMAZHATÓSÁG	egyfunkciós	többfunkciós
KATALITIKUS KÉPESSÉG	gyenge	gyakori, variálható
KIRALITÁS	gyenge	gyakori, variálható
GŐZNYOMÁS	Clausius-Clapeyron egyenlet alapján	elhanyagolható
GYÚLÉKONYSÁG	ált. tűzveszélyes	ált. nem tűzveszélyes
SZOLVATÁCIÓ	gyengén szolvatál	erősen szolvatál
POLARITÁS	hagyományos megközelítés	kérdéses a megközelítés
VARIÁLHATÓSÁG	limitált	korlátlan
ÁR	olcsó	drága, csökkenő tendencia
VISZKOZITÁS (CP)	0.2-100	22-40000
SÚRÚSÉG (G/CM ³)	0.6-1.7	0.8-3.3
REFRAKTÍV INDEX	1.3-1.6	1.5-2.2



1.2. ábra: Az ionos folyadékok leggyakoribb kationjai.

1. lítium-, 2. ammónium-, 3. szulfónium-, 4. foszfónium-, 5. triazolium-, 6. imidazolium-, 7. pirazolium-, 8. thiazolium-, 9. pirrolidínium-, 10. oxazolium-, 11. piridínium-ionok különböző mértékben szubsztituálva, ahol R_x lehet: H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ ($n=0, 1, 2, 3, \dots$), aril-, stb.

Nem vízdoldható		→	Vízdoldható
1	$[\text{PF}_6]^-$		9 $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$
2	$[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$		10 $[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$
3	$[\text{BR}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4]^-$	\rightleftharpoons	6 $[\text{CF}_3\text{SO}_2]^-$
			11 $[\text{NO}_3]^-$
			12 $[\text{Al}_2\text{Cl}_7]^-$
4	$[\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{SO}_2]^-$	\rightleftharpoons	7 $[\text{BF}_4]^-$
			13 $[\text{AlCl}_4]^-$
			14 $[\text{Cl}]^-$
5	$[\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{CO}_2]^-$	\rightleftharpoons	8 $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$
			15 $[\text{Br}]^-$

1.3. ábra: Az ionos folyadékok leggyakoribb anionjai vízdoldhatóságuknak megfelelően csoportosítva.

Az ionos folyadékok alkalmazhatók szerves szintézisekben [Jain, 2005], elektrokémiában [Souza, 2003], folyadékkromatográfiában [Poole, 1986], gázkromatográfiában [Armstrong, 1999], kapilláris elektroforézisben [Yanes, 2001], desztillációban [Arlt, 2002] és végül, de nem utolsósorban folyadék-folyadék extrakciónál [Marták, 2006]. Újabb nagy, ma már intenzíven vizsgált kutatási terület nyílt meg 2000-ben, amikor az első közlemény megjelent ionos folyadékban lejátszódó enzimreakcióról [Erbeldinger, 2000]. Azóta több kitűnő összefoglalót publikáltak az ionos folyadékok enzimkatalízis területén történő alkalmazásáról [Park, 2003; van Rantwijk, 2007]. Nagy előnyük, hogy többszöri alkalommal újra felhasználhatók akár az enzim tisztítása nélkül, mert az enzim általában az ionos folyadékos fázisban marad.

Széleskörű elterjedésük miatt egyre több kutatócsoport foglalkozik az ionos folyadékok toxicitásának, bomlásának vizsgálatával [Ngo, 2000; Wasserscheid, 2002; Swatloski, 2003; Jastorff, 2003; Jastorff, 2005; Pretti, 2006]. Mivel az ionos folyadékok száma nagy variálhatóságuk miatt óriási, ezért nem egyesével, hanem típusokra bontva tanulmányozták a szerkezetük és a biológiai hatásuk közötti összefüggéseket. Ezen információk alapján következtetéseket vontak le arról, hogy az adott ion-kombináció milyen hatást fejthet ki az élő szervezetekre. Jastorff és munkatársai az alábbi négy csoport szerint vizsgálták az ionos folyadékok toxicitását: (1) a kation mag, (2) a kation alkiláncai, (3) az anion és (4) a metabolitok biológiai hatása [Jastorff, 2005]. Általánosságban elmondható, hogy a vizsgált ionos folyadékok döntő többsége nem bizonyult toxikusnak, kevés kivétel pedig a közepesen toxikus kategóriába sorolható [Jastorff, 2005; Pretti, 2006]. Magas hőmérsékleten az ionos folyadékok bomlanak [Ngo, 2000; Wasserscheid, 2002; Swatloski, 2003]. A kationokat tekintve elmondható, hogy az imidazolium sók stabilabbak, mint a tetraalkil-ammónium ionos

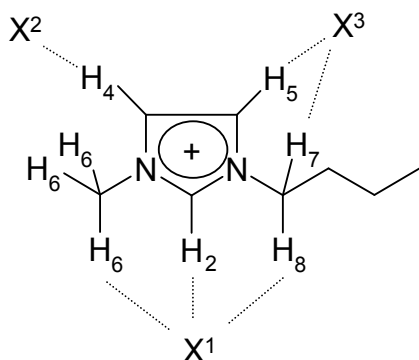
anyagok. A vizsgált anionok relatív stabilitása a következő: $\text{BF}_4^- \approx \text{bisz(triflát)-amin} > \text{tris(triflát)-amin} \approx \text{PF}_6^- \approx \text{AsF}_6^- > \text{I}^- \approx \text{Br}^- \approx \text{Cl}^-$. A bomlási hőmérséklet értéke az oxigén tartalomtól függ. Nitrogén atmoszféra alatt az ionos anyagok termikus stabilitása növekedett, valamint az imidazolium gyűrű H-atomjainak metilezése is fokozta a hőmérséklettel szembeni stabilitást [Ngo, 2000].

Az ionos anyagok növelik az enzim aktivitását, stabilitását és enantioszelektivitását [Yang, 2005; Jain, 2005; Machado, 2005; Lozano, 2005; Okochi, 2007]. Ezen hatások szerkezetvizsgálati tanulmányozása az utóbbi években került előtérbe. Kezdetben Park és Kazlauskas az ionos anyagok fehérje stabilizáló képességét a polaritásukkal hozta összefüggésbe [Park, 2003], amelyet a Reichardt-polaritási skálával és a H-kötések bázikusságával jellemeztek (1.1. ábra). A nagy polaritású oldószerek növelik a poláris szubsztrátok oldhatóságát, ami gyorsabb reakcióhoz és a szelektivitás változásához vezet. Az ionos anyagok és az enzimek közötti kapcsolat azonban ennél bonyolultabbnak tűnik. Számos egyéb tényező, úgymint az anion nukleofilitása, a H-kötések bázikussága, szennyezők, pH, az enzim-szubsztrát-közeg egésze és immobilizált enzimek esetén a hordozó is erősen befolyásolja az aktivitást és a stabilitást.

Hidrofil ionos anyagok vizes oldatában az enzim stabilitása a szerves sókhoz hasonlóan a Hofmeister-sorozatot követi, de hidrofób vagy vízmentes hidrofil ionos anyagokban még bonyolultabbak az összefüggések [Zhao, 2005]. Hidrofil ionos anyagokban a kationok és anionok szerepe a fehérjék és enzimek stabilizálásában általában azonos, ha van jelen víz. Enzim stabilitási szempontból hidrofil ionos anyagok előállítására a legkedvezőbb a kaotrópikus (gyengén hidratált) kation és kozmotrópikus (erősen hidratált) anion kombinálása. Az ionok kozmotrópikus sorrendjét megállapíthatjuk a viszkozitási β -koefficiens és számos egyéb paraméter alapján, úgymint hidratációs entrópia, hidratációs térfogat, hőkapacitás, NMR β' -koefficiens vagy ionmobilitás. Hidrofób vagy vízmentes hidrofil ionos anyagok nem követik a Hofmeister-sorozatot fehérje stabilizálási tulajdonságukban.

Az 1,3-dialkil-imidazolium típusú ionos anyagoknak erősen rendezett háromdimenziós szerkezetük van, amiben a kationok és anionok kiterjedt hálózatot alkotnak H-kötéseken keresztül [Dupont, 2004]. Ez kétdimenziós monomer egységekre lebontva úgy néz ki, hogy egy imidazolium kationt az ionos anyag típusától függően legalább három anion vesz körül és fordítva (F-1. ábra). A legerősebb H-kötés a gyűrű 2. pozícióján lévő H-atommal alakul ki, mert a közvetlen szomszédságában lévő N-atomok nagy elektronszívó képessége itt a legkifejezettebb. Ennek a hatásnak kevésbé kitett másik két H-atom a 4. és 5. pozícióban,

valamint az N-alkil láncok H-atomjai közel azonos savassággal rendelkeznek (1.4. ábra). A PF_6^- -ionnak az egyenlítői F-atomjai a kedveltek a H-kötés létrehozásában, míg a BF_4^- -ionnak a négyből csak három F-atomja vesz részt a kötések kialakításában.



1.4. ábra: Az imidazolium-kation szerkezete.

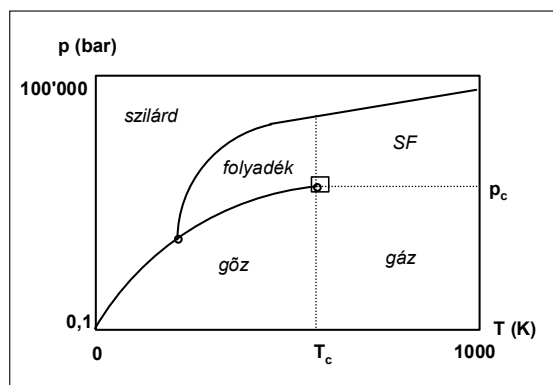
A legsavasabb H atom a 2. pozícióban található ($\text{pK}_a=23,0$). A H_4 , H_5 , H_6 , H_7 , H_8 atomok által létrehozott H-kötések erőssége gyenge vagy közepes, a $\text{H}\cdots\text{X}$ kötések hosszúsága nagyobb, mint 2,2 Å. X: BF_4^- , PF_6^- , CF_3SO_3^- , NTf_2^- [Fehér, 2007].

Röntgen spektroszkópiával imidazolium gyűrűk láncolatát fedezték fel 1,3-dialkil-imidazolium típusú ionos folyadékokban. További vizsgálatok során kiderült, hogy a felszínen az imidazolium-ionok vízszintes orientációban találhatók, valamint sem az anion, sem a kation nem dúsul a felszínen (F-2. ábra).

Tömeg- és infravörös spektroszkópiával megállapították, hogy a H-kötés erőssége a következőképpen változik az anionoknál: $\text{CF}_3\text{CO}_2^- > \text{BF}_4^- > \text{PF}_6^- > \text{BPh}_4^-$. Szilárd fázisú NMR spektroszkópiával is azt találták, hogy az imidazolium típusú ionos folyadékok nagyon erősen rendezettek. Ez a rendezettség a következő képlettel jellemezhető: $\{[(\text{DAI})_x(\text{X})_{x-n}]^{n+}[(\text{DAI})_{x-n}(\text{X})_n]^{n-}\}_n$, ahol DAI az 1,3-dialkil-imidazolium-kation és X az anion. Folyadék fázisban is ehhez hasonló szerkezeti összefüggést találtak, az ion-ion és atom-atom távolságok szilárd és folyékony halmazállapotban is hasonlóak voltak (F-3. ábra). Sőt, még gáz fázisban is kimutatták a fent bemutatott egybefüggő hálózat klasztereit [Dupont, 2004].

1.4.3. Szuperkritikus folyadékok

Jóllehet a 20. század eleje óta folyamatosan használják a szuperkritikus folyadékokat (s.k.F.) az ipari termelésben, alkalmazásuk bonyolultabb szerves molekulák, speciális anyagok szintézisére csak nemrég kezdődött el. Bár még messze vagyunk attól, hogy megértsük a szuperkritikus oldószerek által kiváltott hatásokat, az utóbbi húsz év intenzív kutatásainak köszönhetően sokat fejlődött a tudomány ezen területe. A s.k.F.-ok alternatívát jelentenek a folyadék halmazállapotú oldószerekkel szemben, de korántsem alkalmazhatóak az egyszerű helyettesítésükre.



1.5. ábra: Szupercritikus folyadékok fázisdiagramjai .

Az ábrán a s.k.F.-ok általános fázisdiagramja széles hőmérséklet tartományban és extrém magas nyomásokon látható. A kritikus és hármas pont vastag pöttyel jelezve. A kritikus pont körüli négyzet a magas kompressziótűrési és hőkapacitású régiót jelzi [Jessop, 1999].

Szupercritikus anyagok vagy keverékek, definíciójuk szerint, a kritikus nyomásuk és hőmérsékletük felett, de a szilárd állapot eléréséhez szükséges nyomás alatt léteznek (1.5. ábra). A s.k.F.-okat gyakran a folyadék – gáz köztes állapotként jellemzik. Nem minden tulajdonságukra igaz azonban, hogy az a folyadék- és gázállapot közötti értéket venne fel. Így például kompressziótűrésük és hőkapacitásuk lényegesen magasabb a szupercritikus pontban és akörül, mint folyadék- ill. gáz-, vagy akár a szupercritikus ponttól távoli szupercritikus állapotban. A kritikus hőmérsékletéhez közeli, de még alatta lévő folyadékokat „szubkritikus folyadékoknak”, míg a kritikus nyomás alatti, de ahhoz közeli gázokat „szubkritikus gázoknak” nevezik [Jessop, 1999; Cantone, 2007].

A s.k.F.-ok extrakciójáról és az oldási képességeiről sok információ halmozódott már fel, ami megkönnyítheti egy ipari eljárás során fellépő szeparálási és tisztítási problémák megoldását. A maradékdoldószer mentes termékeknek különös fontossága van a kozmetikai-, gyógyszer-, élelmiszeriparban és az elektronikában. Kémiai szempontból nézve nagyon fontos, hogy bizonyos reakciók sebességét növelik. Például diffúzió által kontrollált reakciók esetén gyors diffúziójuk révén még gyorsabbá tehetik a reakciót. Szintén előnyös tulajdonság, hogy nagyon sok gáz s.k.F.-ban kiválóan oldódik. Ez itt is a reakció sebességének növekedéséhez vezet, ha az oldott gáz koncentrációja a kinetika egyenletben nem nulladrendű. Homogén katalízisben, heterogén katalízisben, ahol szilárd és folyadék fázis közötti anyagtranszport a meghatározó lépés vagy diffúzió limitált enzimkatalíziseknél is jól alkalmazhatók a s.k.F.-ok.

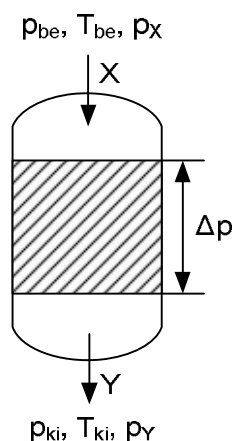
1.4.4. Oldószermentes és szilárd-gáz rendszerek

Az oldószermentes rendszerek szintén nagyon közkedveltek szerves reakciók és biokatalízisek kivitelezéséhez [Yahya, 1998; Güvenc, 2002; Ghamgui, 2006; Güvenc, 2007]. Ebben az esetben az egyik reagens feleslege működik oldószerként [Welton, 2006]. Mivel

nem viszünk be új anyagot a rendszerbe, az oldószer eltávolítására nem kell egy újabb eljárást kidolgozni, ami jelentős költségcsökkentést jelent. Ez külön előny az élelmiszer- és gyógyszergyártásban, ahol nagyon szigorú szabályozások vannak egy új oldószer bevezetésére és a megengedhető maradékoldószer mennyiségére egy adott termékben. Az emelt szubsztrát mennyiségének köszönhetően a reakció során folyamatosan változik a reakcióközeg összetétele és így a tulajdonsága is. Nem előnyös ezt a rendszert nagy viszkozitású reagens esetén alkalmazni, mert rossz kevertetést, ezáltal alacsony reakciósebességet eredményezne. Természetesen inhibíciót okozó szubsztrátból sem célszerű felesleget alkalmazni. Selmi és munkatársai trikaprilin oldószermentes közegben történő előállítása során a szubsztrát szilikagélre történő immobilizációjával védték ki a poláris glicerol abszorpcióját az enzimrészecskékre, valamint így kontrollálták a lipáz regioszelektivitását [Selmi, 1997].

Nyers és izolált enzimek egyaránt működésre képesek szilárd-gáz határfelületen, ezért a szilárd-gáz biokatalízis napjaink egyik ígéretes technológiája. Nagy előnye, hogy a rendszer termodinamikailag teljes mértékben kontrollálható. Már egy miniüzemben is fokozott konverzió és reakciósebesség érhető el a hatékony anyagátadás, a gáz kicsi viszkozitásából következő csökkenő diffúziós limitáció miatt, továbbá magas az enzim és a kofaktorok stabilitása. Az oldószeres fázis hiánya miatt a feldolgozás egyszerűbb, továbbá méretnövelés is könnyen végrehajtható [Lamare, 2004]. Az évek folyamán egyre több enzim bizonyult működőképesnek szilárd-gáz rendszerekben: alkohol dehidrogenáz alkohol és aldehid termelése során [Pulvin, 1986], *Pichia pastoris* alkohol oxidáz etanol oxidációja során [Barzan, 1989], *Candida rugosa* lipázos észterezésben [Ross, 1991], liofilizált *Saccharomyces cerevisiae* sejtek aldehidek redukciójában [Maugard, 2001] és *Rhodococcus erythropolis* dehalogenáz alkil-halogenidek dehalogénezése során [Erable, 2005].

A szilárd-gáz bioreaktorok sematikus ábrája az 1.6. ábrán látható. A szilárd fázisú reaktorágyon a biokatalizátor immobilizált vagy nyers formájában is jelen lehet. Ezen a töltött ágyon halad keresztül a reaktánsokat tartalmazó gáz, amit a következő paraméterekkel lehet jellemezni: moláris összetétel, teljes nyomás és hőmérséklet. A reaktánsok bejutatása a hordozógázba kétféleképpen történhet: telítéssel vagy elpárologtatással. Ez utóbbi technika alkalmazásával a moláris áramlási sebesség jobban kontrollálható [Cantone, 2007].



1.6. ábra: Szilárd-gáz biokatalízis töltött reaktorágyon.

A belépő gázt a hőmérséklettel (T_{be}), nyomással (p_{be}) és a reaktáns parciális nyomásával (p_X), a kilépő gázt szintén a hőmérséklettel (T_{ki}), nyomással (p_{ki}) és a termék parciális nyomásával (p_Y) lehet jellemezni. Δp : nyomáscsökkenés a katalizátor ágyon, X: szubsztrát(ok), Y: termék(ek).

A szilárd-gáz technológia úgynevezett tiszta technológia, mert a szerves oldószerek felhasználását nullára lehet redukálni. Ennek és termodinamikai kontrollálhatóságának köszönhetően már az iparban is alkalmazzák: aromaanyagokat állítanak elő etanol és rövid szénláncú savak reakciójával Novozym 435 enzimmel [Lamare, 2001].

1.4.5. Kombinált technológiák

Mivel az ionos folyadékok, s.k.F.-ok, oldószermentes és szilárd-gáz rendszerek környezetbarát alternatívát kínálnak biokatalízisek kivitelezéséhez, érdemes akár együttesen alkalmazni őket. Egyelőre még az ionos folyadékok és s.k.F.-ok együttes alkalmazását vizsgálták meg. Az ionos folyadék-s.k. CO₂ kétfázisú rendszer meglehetősen szokatlanul viselkedik: (1) míg a CO₂ könnyen oldódik ionos folyadékban (csökkentve ezzel viszkozitását), addig s.k. CO₂ kétfázisú rendszert képez vele, (2) az ionos folyadék térfogata nem növekszik még akkor sem, amikor igen nagy koncentrációban tartalmaz s.k.F.-ot. Ezeket a bináris rendszereket háromféleképpen alkalmazzák biokonverziókban. Az első esetben kihasználják, hogy a s.k.F.-oknak jó az extraktív képessége, ezáltal képesek szerves anyagok kioldására ionos folyadékból [Lozano, 2002; Reetz, 2002; Reetz, 2003; Lozano, 2004]. Létrehoznak egy munkafázist, ami ionos folyadékban oldott enzim oldat valamint egy extraktív fázist, ami a szubsztrátok és termékek nagy részét tartalmazza. A második variáció a kombinált eljárásra, amikor a s.k.F. extrakciójával az ionos folyadék és a szerves oldószer szeparációja érhető el [Scurto, 2002]. Végül a harmadik módszerben az ionos folyadékot az enzim immobilizációja során használják fel. Ekkor az enzim ionos folyadékkal, mintegy köpennyel van körülvéve, ezáltal megnő az élettartama [Hernández, 2006; Lozano, 2007].

Nem biztos, hogy az itt bemutatott környezetbarát nem-konvencionális reakcióközegek használata minden esetben jobbnak bizonyul a hagyományos szerves oldószeres eljárásokkal szemben, sőt bizonyos esetekben az árak is drágábbak lehetnek. A piac azonban folyamatosan

reagál az egészségre ártalmatlan, környezetbarát technológiával készülő termékek iránt mutatkozó növekvő igényekre, hiszen elég valószínű, hogy egy vásárló a diklór-metánnal koffeinmentesített kávét szívesen megvásárolná és valóban meginná.

1.5. Az alkalmazott enzimek

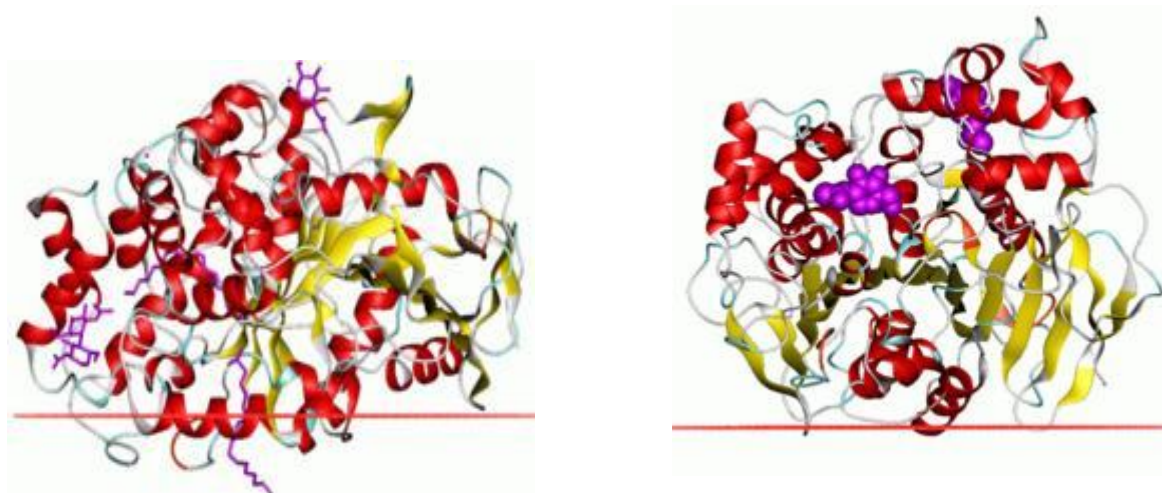
A konformáció változás szempontjából a lipáz enzimeknek két jól elkülönülő csoportja van. Az egyik csoporthoz tartozó lipázok vízben zárt, inaktív, míg vizes-szerves határfelületen vagy szerves közegben egy fedél (lid) elmozdulásával nyitott, aktív konformációt vesznek fel. A másik csoportba olyan lipáz enzimek tartoznak, melyek a különböző oldószerekben nem szenvednek el ilyen jelentős konformáció változást. Dolgozatomban mindkét fajta lipáz enzim vizsgálatára van példa: az előbbire a *Candidia rugosa*, az utóbbira pedig a *Candida antarctica* lipáz B enzim.

1.5.1. A *Candida rugosa* lipáz enzim szerkezete

A katalitikus centrum az enzimmolekulának azon kis része, amelyben az aminosavak egymáshoz térben közel kerülve kitüntetett tulajdonsággal, katalitikus képességgel rendelkeznek. A különböző enzimek katalitikus centrumainak kialakításában eltérő számú és szerkezetű aminosav vesz részt.

A lipázok az egyik legtöbbet tanulmányozott enzimek, mert kezelésük egyszerű, és működésükhöz nem igényelnek kofaktorokat. Függetlenül eredetüktől, közös jellemzőjük, hogy molekulájukban az egymáshoz térben közel kerülő aminosavak α -hélix és β -szalag szerkezetekbe rendeződnek. Az ezeket alkotó aminosavak és azok száma enzimenként változik. Másik jellemzőjük, hogy az aktív centrum környezetében található egy vagy több olyan polipeptidlánc rész, amely konformációs változások révén az aktív centrumot a szubsztrát molekulák számára hozzáférhetetlenné teheti. Ezt a molekularészt huroknak (loop) vagy fedőnek (lid) nevezik. Aktuális konformációját (nyitott: aktív és zárt: inaktív) jelentősen befolyásolja pl. a környezet hidrofíli/hidrofób jellege, a pH és az ionerősség, hiszen ezek hatással vannak az enzimmolekulákon belüli másodlagos kötőerőkre. A lipázok víz/lipid határfelületen rendelkeznek aktív konformációval, ekkor a hidrofób karakterű lid nyitott konformációt vesz fel, lehetővé téve a szubsztrát számára az aktív centrumhoz való kapcsolódást. Ezt nevezik határfelületi aktivációnak.

A *Candida rugosa* lipáz a hasonló nevű élesztőgomba által termelt mikrobiális eredetű enzim, melyet először az 1960-as évek elején izoláltak talajból. A természetben nagy szénatomszámú zsírsavak glicerinnel képzett észterének reverzibilis lebontását katalizálja.



1.7. ábra: A *Candida rugosa* Lip1 enzim szerkezete és aktív centruma.

Jobb oldalon az aktív, nyitott forma, míg a bal oldalon az inaktív, zárt forma ábrája látható. A két alak közti átmenetet a fedél (lid) elmozdulása váltja ki.

A *Candida rugosa* élesztőgomba több lipáz enzimet termel, melyeket izoenzimeknek neveznek. Először ezek közül kettő volt ismert, ekkor LipA, és LipB-ként hivatkoztak rájuk, azonban később, mikor további öt izoenzim létezésére is fény derült, Lip1, Lip2,Lip7 elnevezéssel illette őket a szakirodalom (1.7. ábra). Jelenleg öt izoenzim (Lip1-Lip5) aminosav szekvenciája és térszerkezete tisztázott, a Lip6 és Lip7 izoenzimek szerkezetének kutatása napjainkban is folyik. A Lip1-Lip5 izoenzimek mindegyike 534 aminosavat tartalmaz, molekulatömegük 60 kDa. Aminosavösszetételük nagyfokú (>70 %) egyezőséget mutat. Aktív centrumukat az aminosavlánc 209. szerin, 449. hisztidin, és 341. glutamin tagja alkotja (katalitikus triád). Az aktív centrum mellett kitüntetett szereppel rendelkezik az ún. oxianion „gödör”, amelyet a 123-as és 124-es glicin, valamint a 210-es alanin aminosavak alkotnak. Ezek NH-csoportjai H-híd kötést alakítanak ki az acil-donor szubsztrátmolekula (sav vagy észter) karboxilcsoportjának oxianionjával, stabilizálva ezáltal az oxianiont. A *Candida rugosa* lipázban az aktív centrum melletti lid az összes izoenzimben 26 aminosav molekulából áll, melyek α -hélix szerkezetet alkotnak. A lid aminosav összetétele jelentős különbözőséget mutat az egyes izoenzimekben. Ennek köszönhetően azok hidrofób/hidrofil karaktere eltérő, mely bizonyítottan hozzájárul a katalitikus aktivitásukban és szelektivitásukban tapasztalt eltérésekhez.

A lid nyitott konformációja esetén a szubsztrátmolekulák egy L-alakú, alagút konformációt mutató molekulárisan keresztül kapcsolódnak az aktív centrumhoz. Az alagút feladata tehát a szubsztrát befogadása. Az alagút szerkezete jól illeszkedik az oleinsav molekula szterikus jellegéhez, ami érthető, hiszen a trioleinek a *Candida rugosa* lipáz enzim

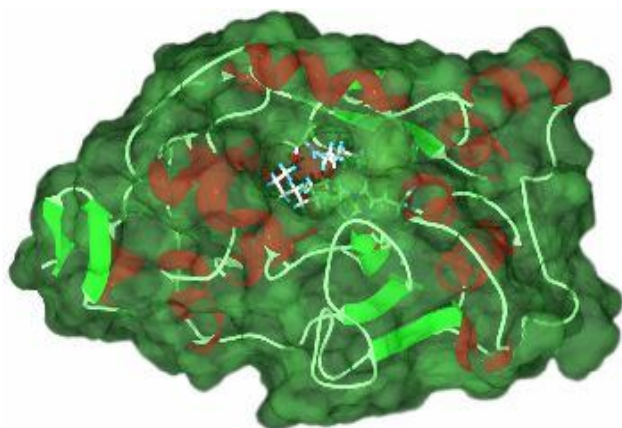
eredeti szubsztrátjai. A Lip1-Lip3 izoenzimek szerkezetét vizsgálva azt tapasztalták, hogy az alagútat alkotó aminosavak között eltérő számú fenilalanin található a Lip1-Lip3 izoenzimekben. Az alagút aromás jellege a Lip1 izoenzimben volt a legerősebb, amely valószínűleg hozzájárul ahhoz, hogy az említett izoenzim észteráz aktivitása erősebb. Az aromás fenilalanint nem aromás valinra cserélve, ezáltal csökkentve az alagút aromás jellegét, a Lip1 izoenzim aktivitása és szelektivitása ketoprofén észtererek hidrolízisében csökkent. Az alagút különböző szakaszaiba nagyobb térigényű fenilalanin és triptofán aminosavakat beépítve a Lip 1 izoenzim szubsztrátspecifitása nőtt és/vagy módosult a különböző szénatomszámú zsírsavak iránt.

Az aktív centrum működése szempontjából az enzimmolekula glikozidációs pontjainak is fontos szerepe van. A Lip 1 izoenzim aminosavláncának a 314-es és a 351-es aszparagin molekuláit kicserélve az enzim aktivitása jelentősen csökkent. Később szerkezeti vizsgálatok igazolták, hogy a 351-es aszparagin molekulának szerepe van a lid konformációs mozgásában. Ezen következtetések helyességét az enzim dextránnal és egyéb szénhidrát-molekulákkal történő módosítása során kapott eredmények is igazolták.

1.5.2. A *Candida antarctica* lipáz B enzim szerkezete

A *Candida antarctica* lipáz B (CALB) az egyik leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben alkalmazott lipáz enzim, habár a titoktartási szabályozások miatt kevés ipari alkalmazását hozták még nyilvánosságra. Az egyik ismert kozmetikai ipari felhasználása az izopropil-mirisztát előállítása [Sharma, 2001; Houde, 2004]. A CALB a hidroláz enzimek osztályába (E.C.3) tartozik. Észter kötések (E.C.3.1), ezen belül is karboxil-észterek kötésein fejt ki hatását (E.C.3.1.1). Triacil-glicerineket hidrolizál zsírsavvá, glicerinné, mono- és diacil-glicerinné (E.C.3.1.1.3).

A *Candida antarctica* gombából kétféle lipáz enzim izolálható a CALA és a CALB [Kirk, 2002], amelyek azonban eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. A CALA határfelületi aktivitást mutat ellentétben a CALB-vel, amit éppen ezért nem tekintenek valódi lipáznak. Ez azt jelenti, hogy a CALA egy „fedő” szerkezettel rendelkezik, amely az enzim aktív állapotában „nyitott” és hozzáférést enged a szubsztrátnak az aktív centrumhoz. Ez a „fedő” struktúra hiányzik vagy nagyon kicsi a CALB-ben. Az enzim teljes szerkezetét Uppenberg és munkatársai tárták fel (1.8. ábra) [Uppenberg, 1994 ; Uppenberg, 1995].



1.8. ábra: A CALB enzim szerkezete és aktív centruma.

Pirossal az α -hélixek, halványzölddel a β -redők, sötétzölddel az enzim felülete van jelölve. Középen az aktív centrum szűk bejárata látható, benne az acil- és alkohol láncokkal [Magnusson, 2005].

A CALB az α/β -hidrolázok szupercsaládjába tartozik [Ollis, 1992]. Képes hidrolizálni észtereket, tioésztereket, fehérjéket, epoxidokat, alkil-halogenideket valamint hasítani hidroxil-nitrilek szénkötéseit. 317 aminosavból épül fel, molekulatömege 33 kDa.

Aktív centrumában a szerin a hidrolázokban megszokott Ser105-His224-Asp187 katalitikus hármas található. Ezen kívül tartalmaz még egy oxianionos lyukat, amely stabilizálja az átmeneti állapotot és az intermediereket. Ebben a lyukban három H-kötés donor hely (Thr40 oldallánc, Gln106 és Thr40 amidok) meghatározott térbeli elrendeződésben található. Az aktív centrumban egy sztereospecifikus zseb is van, amely az enzim nagymértékű enantioszelektivitását magyarázza. Ezt a zsebet a másodrendű alkoholok csak egy adott orientációval tudják megközelíteni, ezért királis reakciók során főképp az (*R*)-izomer képződik [Magnusson, 2005].

A CALB által katalizált acil-csoport transzfer reakciók a ping-pong bi-bi mechanizmus szerint játszódnak le [Magnusson, 2005; Romero, 2005a] az F-4. ábrán látható folyamat szerint. Az ábrán szereplő (*R*)-csoportoktól függően a reakció lehet hidrolízis, észterezés, átészterezés, ha a második szubsztrát amin, akkor aminolízis, valamint átészterezés során az első acil-szubsztrát lehet tioészter is [Magnusson, 2005; de Diego, 2005].

1.6. Királis szubsztrátumok rezolválási reakciói szerves közegben

Számos királis gyógyszerhatóanyag sikeresen állítható elő lipáz enzimek segítségével hidrolízis, átészterezés, perhidrolízis, ammonolízis és aminolízis reakciókban (Gotor-Fernandez, 2006). Ezek közül ebben a fejezetben a királis propionsavszármazékok reakcióit mutatom be.

1.6.1. Profének reakciói

A királis karboxilsavak közül főként a királis propionsavak és azok származékai előállításának van gyakorlati jelentősége. A 2-es szénatomon aril szubsztituenst tartalmazó propionsavak, másnéven profének gyulladáscsökkentő, láz-, és fájdalomcsillapító hatású szerek. Legjelentősebb képviselőik a naproxén, ibuprofén, ketoprofén és szuprofén. Ezek (*S*)-izomere rendelkezik a kívánt farmakológiai hatással. A profének lipázkatalitikus észterezését számos N,N-dialkil-amino-csoportot tartalmazó alkohollal, etilén-glikollal valamint di- és trietilén-glikollal tesztelték. Az (*R,S*)-naproxén-2,2,2-trifluoro-etil észternek 2-N-morfolino-etanolal történő átészterezése során a reakció végén az (*S*)-naproxén-2-N-morfolino-etilészterre vonatkoztatva ~90 %-os enantiomerfelesleget (ee_p) kaptak (Shau-Wei, 1999). Katalizátorként szuszpendált *Candida rugosa* lipázt alkalmaztak a reakcióelegyben. Az enantioszelektivitás a reakcióelegy víztartalmával fordított arányosságot mutatott. Más N,N-dialkil-amino-alkoholokkal, mint pl. a 2-dimetil-amino-alkohol, 3-dimetilamino-1-propanol, nem tapasztaltak enantioszelektivitást ($E \sim 1$). A naproxén etilén-glikollal, valamint di-, és trietilén-glikollal való észterezése csak moderált enantioszelektivitással játszódott le ($E = 6, 11, 17$), ezért ezek nem tekinthetők jó alkoholnak a naproxén észter származékainak előállításához.

1.6.2. A 2-szubsztituált karbonsavak enzimkatalitikus észterezése

A 2-es szénatomon nem aril szubsztituenst tartalmazó propionsavak származékai között a növényvédőszer gyártás során fontos intermedierek találhatók. Az (*R,S*)-2-klór- és (*R,S*)-2-bróm-propionsavakat a 2-fenoxi-propionsav származékok előállításához használják. Ezek herbicid hatású vegyületek (Cremlyn, 1978), azonban csak az (*R*)-izomerek rendelkeznek biológiai aktivitással (Jager, 1983). A *Candida rugosa* lipáz jó aktivitást és enantioszelektivitást mutatott racém Cl-, Br-, és p-Cl-PhO-propionsavak 1-butanollal n-hexán oldószerben történő észterezésében (Kirchner, 1985). Háromszoros feleslegben alkalmazva az acil-akceptor alkoholt, a reakciót mindhárom esetben 42-45 % konverziónál megállították, és a termékekre vonatkoztatva 96, 95, ill. 79 %-os enantiomerfelesleget értek el. A reakciók fő termékei az (*R*)-észterek, míg az (*S*)-savak visszamaradtak a reakcióelegyben. Érdekeség, hogy a reakcióelegy hozzáadott vizet nem tartalmazott, és az észterezési reakcióban folyamatosan képződő vizet nem távolították el a reakcióelegyből. Ugyanezen szubsztrátokkal a *Porcin pancreas* lipázt alkalmazva csak alacsony aktivitás volt tapasztalható, és az enantiomerfelesleg (ee_p) is csak 45 % körüli volt.

E herbicid hatással bíró királis propionsav észterek előállítása kapcsán a fenti elektron akceptor halo- és halofenoxi- szubsztituenseken kívül elektrondonor alkoxi- és fenoxi szubsztituensek szerepét is vizsgáltuk [Gubicza, 1994]. A *Candida rugosa* (akkori nevén *Candida cylindracea*) lipáz enzim aktivitását és enantioszelektivitását hasonlítottuk össze az (*R,S*)-2-metoxi-, 2-etoxi-, 2-propoxi-, 2-izopropoxi-, és 2-fenoxi-propionsavak 1-butanollal való észterezési reakcióiban.

A racém 2-Cl-propionsav rezolválási reakciói vizsgálatának másik célja annak tisztázása volt, hogy miként befolyásolja az acil-akceptor alkohol molekula jellege a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitását és enantioszelektivitását [Bodnár, 1990, Gubicza, 1994]. Metanollal és etanollal nem tapasztaltunk reakciót. A 3-, 4- és 5-szénatomos normálláncú és a hidroxil csoportot a 2-es szénatomon tartalmazó elágazó láncú alkoholokat összehasonlítva minden esetben a normálláncú alkoholokkal ment végbe az észterezési reakció nagyobb sebességgel. Az (*R,S*)-2-klór-propionsav észterezésekor 10 %-os konverzió eléréséhez 1-butanollal 1.5 h, míg 2-butanollal 2 h volt szükséges. Az (*R*)- és (*S*)- izomerek sebességeinek hányadosával jellemzett enantioszelektivitás 15 (2-pentanol) és 26.9 (1-butanol) között változott. Az enantioszelektivitás és az alkoholok szénatomszáma valamint normál vagy elágazó jellege között nem találtunk kapcsolatot.

Azon lehetőségeket kutatva, hogyan növelhető tovább a *Candida rugosa* lipáz aktivitása és enantioszelektivitása az (*R,S*)-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciójában, vizsgáltuk a szerves oldószerek és a víztartalom hatását [Bodnár, 1990; Gubicza 1992]. Az aromás benzolt, toluolt, valamint alifás n-hexánt és n-oktánt összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az oldószerek log P-vel jellemzett hidrofóbicitása és a 2-butil-propionát észter képződés sebessége egyenesen arányos. Az apoláris jellegű oldószerekben, mint a n-hexán és a n-oktán, kétszeres reakciósebességet tapasztaltunk az aromás szerkezetű benzolhoz és toluolhoz képest. Ezzel szemben az enantioszelektivitás az oldószerek log P-jével közel lineárisan csökkent, n-oktánban az enantioszelektivitás jellemzésére használt (*R*)- és (*S*)- izomerek sebességének hányadosa mindössze 5 volt. A kísérleteket azonos kezdeti víztartalom beállításával végeztük. Az eredményeket azzal magyaráztuk, hogy a kis log P-jű hidrophil jellegű oldószerek elvonhatják az enzim működéséhez nélkülözhetetlen minimális mennyiségű vizet az enzim környezetéből.

A reakcióelegy víztartalma minden enzimkatalitikus észterezési reakcióban nagy fontosságú, hiszen egyrészt szükséges az enzimkatalizátor aktív konformációjának megőrzéséhez, másrészt az észterezési reakció egyensúlyára is hatással van. Ez tükröződött azokból az eredményekből is, melyeket (*R,S*)-2-klór-propionsav és 1-butanol 0.02-0.65 %

kiindulási víztartalom mellett végzett észterezése során nyertünk. Hozzáadott víz nélkül (0.02 % víztartalom) gyakorlatilag nem tapasztaltunk reakciót. A legmagasabb enzimaktivitást (legnagyobb reakciósebességet) akkor kaptuk, amikor 0.25 % kezdeti víztartalmat állítottunk be, majd ennél magasabb víztartalom esetén az észterezési reakció egyensúlya megváltozott, és a hidrolízis sebességének megnövekedése miatt az észterképződés látszólagos sebessége csökkent.

A fenti észterképződési reakciókban a *Candida rugosa* lipáz aktivitásának a 0.2% körüli, enantioszelektivitásának pedig az ennél alacsonyabb víztartalom kedvezett. Ezt az ellentétet próbáltuk áthidalni akkor, amikor a reakcióelegy víztartalmának egy részét etilén-glikollal helyettesítettük az (*R,S*)-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciójában. Az etilén-glikol a vízhez hasonlóan H-híd kötések kialakítására képes, ezért működhet vízutánzó adalékként. A kísérleteket kloroformban végeztük, a kiindulási víztartalmat 0, 50 és 100%-ban helyettesítettük etilén-glikollal. Amikor a reakcióelegy sem vizet, sem etilén-glikolt vagy vizet nem, csak 0.1% etilén-glikolt tartalmazott, nem tapasztaltunk észterképződést. Abban az esetben, amikor a vizet 50%-ban etilén-glikollal helyettesítettük, 0.29 mmol/h-ról 0.37 mmol/h-ra, tehát mintegy 30%-kal nőtt a reakciósebesség. Érdekesség, hogy noha az optimális kezdeti víztartalom 0.2% volt kloroformban, amikor 0.2% víztartalom mellett a reakcióelegy 0.1, illetve 0.2% etilén-glikolt tartalmazott, a reakciósebesség 0.29 mmol/h-ról 0.42 illetve 0.44 mmol/h-ra, azaz, mintegy 50%-kal nőtt. További etilén-glikol hozzáadásra az észterképződés sebessége csökkenni kezdett.

Az etilén-glikol a *Candida rugosa* lipáz enzim enantioszelektivitását is fokozta. Benzolban közel 7, n-hexánban 9, toluolban 11, míg metil-ciklohexánban és kloroformban 25, ill. 29%-kal nőtt az észterek kezdeti reakciósebességének hányadosával kifejezett enantioszelektivitás [Gubicza, 1993].

1.7. Aroma észterek előállítása nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakciókkal

A Magyar Élelmiszerkönyv 1-2-88/388 számú előírása [Magyar Élelmiszerkönyv] foglalkozik az élelmiszerekben vagy azok felületén illat és/vagy íz kialakítására szolgáló aromaanyagokkal és az előállításukra szolgáló nyersanyagokkal, ezen túl az ide vonatkozó fejezet pontosan leírja, hogy mi a különbség a szintetikus vagy mesterséges, a természetazonos és a természetes aromák között.

Az előírás szempontjából az “aroma” aromaanyagokat, aroma készítményeket, hőkezeléssel előállított aromaanyagokat, füst aromákat vagy ezek keverékeit jelenti.

- Az “aromaanyag” egy ízesítő tulajdonsággal rendelkező, meghatározott kémiai anyag, mely a következő módon nyerhető:

a. megfelelő fizikai (pl. desztillációval, oldószeres kivonással, szuperkritikus gáz extrakcióval) vagy enzimes, illetve mikrobiológiai (bioszintézis, biotranszformáció) eljárással emberi fogyasztásra alkalmas nyers-, vagy szokásos élelmiszertechnológiai eljárásokkal (pl. szárítással, pörköléssel, fermentálással) feldolgozott növényi vagy állati eredetű anyagból, - **természetes aroma**;

b. vegyi szintézissel vagy olyan elkülönítéssel, hogy az így kapott anyag kémiaileg azonos az *a.* pont szerinti növényi vagy állati eredetű anyagban természetes tartalomként jelen levő aromaanyaggal, - **természetazonos aroma**;

c. olyan vegyi szintézissel, mely az *a.* pont szerinti növény vagy állati eredetű anyagban természetes tartalomként jelenlévő aromaanyagoktól kémiaileg eltérő anyagot eredményez – **mesterséges aroma**.

A természetes jelzővel illetett aromaanyagoknak meg kell felelniük a Food Chemical Codex (FCC) minőségi kritériumainak. Az előírás szerint a hatóanyag-tartalom általában nagyobb, mint 98 %, a savszám pedig 1 mg_{KOH}/g alatti. A természetes és a természet-azonos észtereket izotópos vizsgálatokkal különböztetik meg. A szén és hidrogén izotóp arány analízis a leginkább használt technika a természetes termékek hitelesítésére. A ¹⁴C/¹³C arányával megállapítható, hogy egy fosszilis nyersanyagból származó vegyületnek alacsony a ¹⁴C/¹³C-hoz viszonyított aránya, mivel annak ¹⁴C tartalma az idővel bomlik. Egyes anyagoknál ez a különbség számottevő, másoknál kevésbé. Egyértelműen elfogadott határok még nincsenek.

A természetes etil-acetát likőripari szempontból az egyik legjelentősebb, legtöbb helyen felhasznált észter. Leginkább mesterséges gyümölcs- és brandy aromák gyártásához használják, a friss gyümölcsaromája és jellegzetes illata miatt. Hasonlóan fontos likőresszenciának számít az i-amil-acetát, melyet leginkább banán- és barackaromaként használnak fel.

1.7.1. Az etil-acetát előállítása

Az etil-acetát nem-konvencionális közegben történő előállítását már 1986-ban vizsgálta Armstrong és Yamazaki [Armstrong, 1986]. A vizsgált oldószerek közül a n-hexán reakcióközegben tapasztalták a legjobb hozamot. Bár az aroma észterek enzimkatalitikus észterezéssel történő előállításának széleskörű irodalma van, etil-acetát előállításával azonban alig foglalkoztak. Feltehetően azért, mert bár a természetes etil-acetát értékes, drága termék, a kis szénatomszámú savból és alkoholból történő előállítás az erős inhibíció miatt komoly gondot okozott.

Az inhibíciót elsősorban az ecetsav okozza, így a reakciónak az alkoholfelesleg kedvez. Ugyanakkor az etanol is okoz kisebb mértékű gátlást, ami a nagyobb alkoholfelesleg, illetve az etanol főlegében végrehajtott oldószermentes észterezés során csökkenő tendenciát mutató kezdeti reakciósebességeken tűnik szembe. Ennek megfelelően az oldószer jelenléte az enzim stabilitása szempontjából fontos (a rendszerben nem lesz túl tömény a szubsztrátum). Kézenfekvő tehát az etil-acetát ionos folyadékban történő enzimes előállításának tanulmányozása, amit –az irodalom áttanulmányozása alapján– korábban még nem vizsgáltak.

1.7.2. Az izoamil-acetát előállítása

1.7.2.1. Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása szerves oldószerben

Annak ellenére, hogy már 1989-ben is több tonna izoamil-acetátot állított elő és használt fel az ipar [Welsh, 1989], a 80-as és 90-es években csak szerény eredményeket tudtak felmutatni ezen anyag biokatalízise terén. Legfeljebb 80%-os hozamot tudtak elérni igen magas enzimkoncentráció mellett is [Langrand, 1988; Langrand, 1990; Welsh, 1990; Razafindralambo, 1994].

1997-ben jelent meg Vija és munkatársainak igen korszerű, bár nagyon szűkszavú közleménye az izoamil-acetát előállításáról mind szerves közegben, mind s.k. CO₂-ban. Szubsztrátként ecetsavat használtak n-hexán oldószerben, Novozym 435 enzim alkalmazása mellett. A kapott termék hozama erősen függött a szubsztrátok koncentrációjától és csak az ipari szempontból alkalmatlan, alacsony koncentrációknál értek el magas hozamot (95%). Kidolgoztak egy folyamatos eljárást, ahol a reagenseket folyamatosan áramoltatták n-hexánban oldva egy, az enzimet tartalmazó kolonnán [Vija, 1997].

Látván az izoamil-acetát enzimatikus előállításának sikertelenségét és a lezajlódo folyamat megértése terén felmerült űrt, Hari Krishna és csoportja részletesebb vizsgálatba fogott, amelyet két egymást követő évben megjelent publikációjukban közöltek [Krishna,

2000; Krishna, 2001]. Első publikációjukban ecetsavat használtak szubsztrátként n-heptán oldószerben, az alkalmazott immobilizált enzim *Mucor miehei* lipáz volt. Vizsgálták az enzim és a szubsztrát koncentrációk változtatásának és az inkubációs időnek a hatását a reakcióra. RSM („respons surface methodology” = többparaméteres kísérlettervezés”) statisztikai módszerrel, a kísérleti eredményekkel jó egyezést mutató modellt dolgoztak ki arra, hogy a hozam hogyan változik 20% és 99,6% között a fenti paraméterek függvényében. Azt találták, hogy akárcsak n-hexánban [Vija, 1997], 80% feletti hozamot csak alacsony szubsztrát koncentrációnál (<0,1 mol/l) és hosszú reakció idő után (72 h) értek el, míg 0,18 mol/l-nél nagyobb koncentrációk esetén a hozam igen kicsi értékeket vett fel.

Az acil-csoport forrás hatását Romero és kutatócsoportja is vizsgálta n-hexán szerves oldószerben [Romero, 2005a]. Négyféle szubsztrátot megvizsgálva az alábbi sorrendet állították fel: ecetsav-anhidrid > etil-acetát > ecetsav > ammónium-acetát, tehát az eddigiekkel megegyező módon [Rizzi, 1992; Krishna, 2001] itt is az ecetsav-anhidrid bizonyult a legjobb acil-donor szubsztrátnak. A szerzők következő cikkükben beszámoltak kinetikai vizsgálataik eredményeiről [Romero, 2007], amelyben a fent meghatározott optimális paramétereket használták fel. Azt találták, hogy az izoamil-alkohol és az ecetsav-anhidrid (így az ecetsav) Novozym 435 lipáz enzim által katalizált reakciója a ping-pong bi-bi mechanizmus szerint játszódik le. Mivel immobilizált enzimet használtak, az anyagtranszport külső diffúzió általi limitációjának megállapításához méréseket végeztek különböző keverési sebesség mellett. Jóllehet azt állapították meg, hogy nincs hatással a külső diffúzió a reakcióra, ez az eredmény fenntartással kezelendő, mert egy igen szűk keverési sebesség tartományban (100-300 rpm) mértek és a mérési pontok gyakorisága sincs feltüntetve.

1.7.2.2. Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása oldószermentes közegben

Hari Krishna és kutatócsoportjának azon megállapítása után, hogy az alkohol feleslege szerves oldószerben nagyobb konverziót eredményezett rövidebb idő alatt [Krishna, 2001], logikus lépés volt az izoamil-acetát biokonverziójának oldószermentes környezetben történő vizsgálata, mind környezetvédelmi, mind gazdaságossági szempontból. Güvenc és munkatársai 2002-ben jelentették meg oldószermentes rendszerben elért eredményeiket [Güvenc, 2002]. Ecetsavból és izoamil-alkoholból *Candida antarctica* lipáz B enzimmel állítottak elő izoamil-acetátot. Az enzim típus, enzim mennyiség, reakcióidő, hőmérséklet, keverési sebesség vizsgálata során lényegében hasonló eredményeket kaptak és megállapításokat tettek, mint az eddig taglalt kutatócsoportok szerves oldószerben. Nagymértékű előrehaladást értek el a szubsztrát és termék koncentrációk növelése terén.

Habár a hozam nem haladta meg a 80%-ot, de a reakcióidő lecsökkent 6 órára, miközben a keletkező izoamil-acetát koncentrációja 2.5-szerese volt az eddig ismertett eredményekhez képest. Eddig az ecetsavat csak igen csekély sikerrel tudták alkalmazni magasabb koncentrációknál, itt igen magas volt ez az érték (3,6 mol/l).

1.7.2.3. Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása szuperkritikus folyadékban

A legkorábbi példa izoamil-acetát szuperkritikus közegben, egész pontosan s.k. CO₂-ban történő előállítására a már említett Vija és munkatársai által közölt cikkben található [Vija, 1997]. Ecetsav helyett ammónium-acetátot alkalmaztak acil-donorként, választásukat azzal indokolva, hogy az ammónium-ion képes az enzim mikrokörnyezetében lévő víz pH-ját befolyásolni. Valóban, ecetsavval semmilyen reakciót nem tapasztaltak. Az izoamil-alkoholt az ammónium-acetáthoz képest kétszeres feleslegben alkalmazták. Vizsgálták a nyomás, a szubsztrát koncentráció és a hőmérséklet hatását a hozamra és a kezdeti reakciósebességre, de furcsa módon egyik paraméter sem bizonyult erősen befolyásoló tényezőnek. Ez különösen meglepő a hőmérséklet esetén, hiszen alacsony hőmérsékleten a s.k. CO₂ kovalensen módosítja a fehérjék amino-csoportját, de az így képződő komplexek 55 °C felett disszociálnak [Kamat, 1995]. Ezek az eredmények az addigi irodalomban közölt adatokat messzemenően felülmúlták, így például a n-hexánban 80%-os hozam eléréséhez négyszeres alkohol felesleg kellett [Razafindralambo, 1994], míg ők ugyanezt az értéket 10%-os alkohol felesleggel érték el.

2005-ben jelent meg Romero és Knez közös kutatásainak eredménye az izoamil-acetát bioszintéziséről s.k. CO₂-ban [Romero, 2005b], amelyben vizsgálták az enzim stabilitását, az acil-csoport természetének, az enzim/szubsztrát-, a CO₂/szubsztrát aránynak, a nyomásnak és a hőmérsékletnek a hatását. A n-heptánban kapott adatokkal közel megegyezően [Krishna, 2001] a különböző típusú acil-csoportok vizsgálata során az alábbi sorrendet állították fel: ecetsav-anhidrid > ecetsav > ammónium-acetát > etil-acetát. Az ecetsav-anhidriddel másfélszer akkora hozamokat kaptak, mint ecetsavval, bár itt 11% autokatalízist is mértek, míg a másik három szubsztrátnál nem volt autokatalízis. Emelt szubsztrát koncentrációknál (0,8 mol/l) a különbség még élesebb volt, hiszen ecetsav-anhidriddel 95%-os, míg ecetsavval maximum 10%-os hozamot értek el, amelyet valószínűleg ezúttal is az ecetsav nagy inhibíciója okozott.

1.7.2.4. Az izoamil-acetát enzimkatalitikus előállítása ionos folyadékokban

Ionos folyadékokban nem vizsgálták az izoamil-acetát biokatalízisét. Az egyetlen irodalmi példa izoamil-acetát előállítására ionos folyadékokban Jiang és munkatársai közleményében található [Jiang, 2004]. Karbonsavak és alkoholok észterezési reakciót vizsgálták különböző ionos folyadékokban *p*-toluol-szulfonsav katalizátorral. Ecetsav szubsztrátból kiindulva [bmim]PF₆ és [emim]PF₆ ionos folyadékokban 24 ill. 28 h alatt 78.4% és 74.9% alkohol konverziót értek el 98%-os szelektivitás mellett.

1.8. Biokenőanyag előállítása

1.8.1. Zsírsavak és rövid szénláncú alkoholok észterezése

A lipáz enzimmel, nem konvencionális közegben lejátszódó észterezés alkalmas a kis molekulatömegű aromaészterek előállításán túl mind rövid és közepes molekulatömegű észterek, mind hosszabb szénláncú, többértékű észterek szintézisére.

Nagy molekulatömegű észterek előállítását is vizsgálták lipáz enzim segítségével szerves oldószerekben hosszú szénláncú alkoholokat és szintén hosszú szénláncú savakat alkalmazva szubsztrátként [Halling, 1994]. Az ilyen reakciókat kinetikai szempontból vizsgálva a bi-bi ping-pong mechanizmus szerinti csoportba sorolták. Eltérő méretű szubsztrátok észterezését is régóta tanulmányozták szerves oldószerben: pl. különböző rövid szénláncú savak (tejsav) és zsíralkoholok észtereinek előállítását, amelyeknek fontos élelmiszeripari felhasználása van [Kiran, 2001].

Hosszú szénláncú savak, zsírsavak rövid szénláncú alkoholokkal lejátszódó lipáz enzimmel katalizált észterezését azonban jóval kevesebb esetben tanulmányozták. Közülük a gyártás nagyságrendjének köszönhetően a biodízelle vagyis a metanol zsírsav észtereire összpontosul a legnagyobb figyelem, pedig a zsírsavak rövid szénláncú alkoholokkal alkotott észtereinek számos különböző ipari alkalmazási lehetősége van [Allen, 1996]. Az olajsav az egyik legfontosabb zsírsav a természetben, növényi olajokból gyártható, propanollal, butanollal és más hasonló alkohollal képzett észterei kenőanyagként alkalmazhatók. A környezetbarát módon gyártott tiszta és természetes kenőanyagok egyre nagyobb figyelmet érdemelnek, mivel nem tartalmaznak toxikus anyagot és biológiailag lebonthatók.

A kozmaolaj szeszipari lepárlási melléktermék, átlagos összetétele: 10 % etanol, 13 % n-propanol, 15 % i-butanol, 51 % i-amil-alkohol, 11 % egyéb alkohol és víz. Manapság a kozmaolajat elégetik, hogy fedezze a desztilláció energiaigényét. A kozmaolaj olajsavval való észterezését kénsav katalizátorral török kutatók tanulmányozták, és biokenőanyagot

gyártottak ipari célokra [Özgülsün, 2000]. Ez az eljárás azonban nem környezetbarát, s bár a kiinduló anyagai valóban természetes, „bio” eredetűek, a termékben a katalizátorból nyomokban maradó sav nem előnyös a kenőanyag felhasználásánál. Ezért a savkatalízist mindenképpen célszerű lenne enzimes katalízissel kiváltani.

A kozmaolaj komponensek és a zsírsavak észterezését vizsgálták amerikai és indiai kutatók *Aspergillus terreus*-ből kinyert lipáz enzim segítségével nem konvencionális közegben [Gulati, 2003]. Az 1.5. táblázatban mutatom be a 48 óra alatt elért konverziókat. Mint látható, a kozmaolaj komponensei hasonlóan reagáltak a hosszabb zsírsavakkal, de az olajsavval nem volt kimutatható konverzió.

1.5. táblázat: Az *Aspergillus terreus* lipáz által katalizált észterezés konverziói (%) n-hexánban 37 °C-on 48 óra elteltével [Gulati, 2003].

AZ ALKALMAZOTT ZSÍRSAV	METANOL	I-PROPANOL	I-AMIL-ALKOHOL	BUTANOL
Mirisztinsav (C _{14:0})	79	51	62	35
Palmitinsav (C _{16:0})	64	50	62	20
Sztearinsav (C _{18:0})	66	62	65	21
Olajsav (C _{18:1})	0	0	0	0

A kozmaolaj komponenseihez hasonló alkoholokból kiinduló oleátok előállításáról többen is beszámoltak rögzített *Candida antarctica* lipáz felhasználásával. i-Propil-oleát és további zsírsavészterek enzimes előállításának kinetikai vizsgálatát mutatja be Garcia [Garcia, 1996]. Kinetikai paramétereket is meghatároz, bár megállapítja, hogy az alacsony forráspontú i-propanol (82 °C) valószínűsíthető azeotróp képzése miatt azok nem teljesen alkalmasak a rendszer leírására. Az általa meghatározott 13 kinetikai paraméter miatt összehasonlításuk is nehézkes és mivel a 13 paramétert egyetlen görbére illesztette, azok definiáltsága sem egyértelmű. Szabad állapotú és immobilizált lipázt is használtak (*Rhizomucor miehei*) Oliveira és munkatársai [Oliveira, 2001] etil-oleát előállítására. A folyamatot kinetikai szempontból vizsgálták turner komplex kialakulását feltételezve, hat paraméteres modellt használva. Megállapították, hogy mind a szabad, mind a rögzített enzim katalizálja az olajsav és etanol reakcióját, meghatározták a kinetikai modell paramétereit. Szintén etanol és olajsav észterezését vizsgálták Hazirka és munkatársai [Hazirka, 2001], akik ping-pong mechanizmust feltételeztek és meghatározták a kinetikai paramétereket is. Megállapították, hogy az alkalmazott oldószer is jelentős hatással van az elérhető hozamokra.

1.8.2. Az észterezés kinetikai vizsgálata

Az enzimek által katalizált reakciókat sokféle szempont szerint lehet csoportosítani (az enzim típusa, felhasználás, eredet, in vivo, in-vitro stb.), azonban ha mint kémiai reakciókat tekintjük őket, akkor a két legelterjedtebb az Alberty és a Cleland-féle csoportosítás:

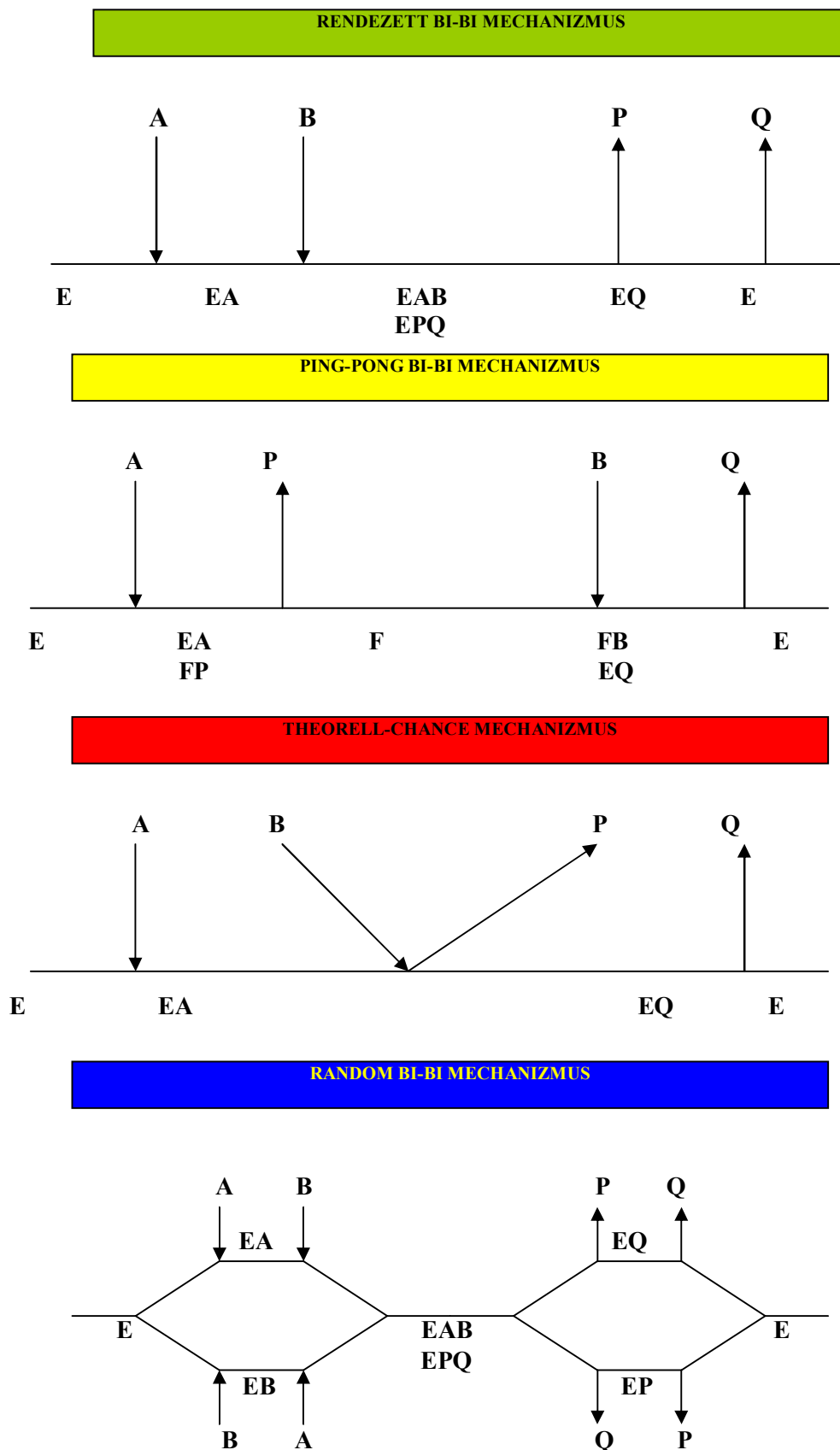
Alberty két szempont szerint osztotta be az enzimreakciókat:

1. a reakció szöchiometriája szerint,
2. a reakció folyamán kialakuló komplexek száma és jellege alapján.

A Cleland-féle nomenklatura szerint a reagáló szubsztrátok illetve a termékek számának jelölése uni, bi, ter, quad. Egy olyan reakció tehát, melyben két szubsztrát és két termék vesz részt bi-bi-nek tekinthető. Ilyen a lipázzal történő enzimatisztálás is. A lehetséges mechanizmusok bi-bi reakcióknál az 1.9. ábrán láthatóak [Segel, 1975; Keleti, 1978].

A rendezett (ordered) bi-bi mechanizmus szerint először mindkét szubsztrát meghatározott sorrend szerint kötődik az enzimhez, majd szintén meghatározott sorrend szerint leválik az egyik termék, majd a másik. A ping-pong bi-bi mechanizmusnál az egyik szubsztrát kötődését követően rögtön leválik az egyik termék, majd a másik szubsztrát kötődik az enzimhez, s végül leválik a másik termék. A Theorell-Chance mechanizmus olyan reakciósémát ír le, ahol a második szubsztrát kötődése és az első leválása gyakorlatilag egyidejűleg következik be, így nem tud kialakulni enzim-szubsztrát komplex. A random bi-bi mechanizmusnál nincs meghatározott sorrendhez kötve az egyes szubsztrátok kötődése illetve a termékek leválása, hanem véletlenszerűen történhetnek meg ezek a folyamatok.

Annak eldöntésére, hogy a bi-bi mechanizmusok közül melyik érvényes az adott enzimes reakciónál, a klasszikus grafikus eljárásokat célszerű első lépésben alkalmazni [Keleti, 1978]. A dupla reciprok módszerrel kapott $1/\text{sebesség}$ - $1/\text{szubsztrát koncentráció}$ egyenesek számos esetben – de nem mindig – elárulják a mechanizmust. Ha pl. a különböző kiindulási koncentrációnál kapott reciprok egyenesek párhuzamosak, a ping-pong bi-bi mechanizmus valószínűsíthető. Ha viszont egy közös pontban metszik egymást, akkor a rendezett mechanizmus tűnik érvényesnek. Ha nem egyeneseket kapunk, nagy valószínűséggel gátlások léptek fel. Ilyen esetekben a grafikus módszerek alkalmazása nem nyújt megfelelő támpontot.



1.9. ábra: A bi-bi reakciók mechanizmusai.

Azokat a publikációkat, ahol kinetikai szempontból is vizsgálták az olajsav szerves oldószerben lipáz enzimmel történő észterezését, az 1.6. táblázatban foglaltam össze. Látható, hogy butil-alkoholnál hosszabb szénláncú alkoholt egyik szerző sem vizsgált. Rövidebb szénláncú alkoholok esetén az alkohol gátló hatását minden esetben valamilyen módon feltételezték, de az olajsav ilyen hatását is említik [Goddard, 2000]. A kinetika leírására a legtöbb esetben a ping-pong bi-bi modellt használták, de található annak szélsőségesen eltorzított alkalmazására is példa, (Oliveira, 15 nagyságrendnyi eltérés a kinetikai paraméterekben) valamint nagymértékű egyszerűsítések is (pl. egy szubsztrátos reakció) [Goddard, 2000]. Több esetben a vázolt kinetika csak nagyon szűk koncentráció tartományban alkalmazható. A táblázatból kitűnik, hogy ezek a részletesnek tűnő kinetikai vizsgálatok nem tekinthetők a reakció megfelelő leírásának. Az észterezési folyamat kinetikájának meghatározásához fejlesztések, finomításokra van szükség.

1.6. táblázat: Az olajsav észterezésének kinetikai vizsgálatai.

ALKOHOL	ENZIM	MODELL	HIVATKOZÁS	MEGJEGYZÉS
i-propil-alkohol	Novozym 435 <i>Candida antarctica</i>	ordered bi-bi 13 paraméter, a szubsztrátok és a termékek kompetitív inhibitorok	[Garcia, 1996]	nagy az illesztés hibája, igen sok paraméter egyetlen mérésre illesztve
butil-alkohol	immobilizált <i>Candida rugosa</i>	ping-pong bi-bi 5 paraméter a sav és az alkohol mint inhibitor	[Zaidi, 2002]	28 % a maradó hiba, szűk mérési tartomány (0,1-1 mol/l)
etanol	immobilizált <i>Rhizomucor miehei</i>	random bi-bi 4 paraméter az alkohol mint inhibitor	[Oliveira, 2001]	15 nagyságrendnyi különbség az egyes paraméterek között, kvázi egy szubsztrátos kinetika
etanol	immobilizált <i>Rhizomucor miehei</i>	Michaelis-Menten 2+1 paraméter az alkohol mint inhibitor	[Goddard, 2000]	minden alkohol koncentrációra más kinetikát használ, pszeudo egy szubsztrátos kinetika
etanol	szabad, sertés hasnyálmirigyből izolált	ping-pong bi-bi 4 paraméter az alkohol mint inhibitor	[Hazirka, 2002]	nagyon szűk mérési tartomány 0,3-0,8 mol/l

1.9. Glicerín-monosztearát előállítása szerves oldószerben

1.9.1. Glicerín-monosztearát előállítása hidrolízissel

A monogliceridek biokatalitikus előállítása többféle úton is lehetséges. Az egyik út a zsírok és olajok részleges hidrolízise. A hidrolízist legegyszerűbb módon 1,3-specifikus lipáz alkalmazásával lehet megoldani. Ennek nagy hátránya, hogy 1 mol monoglicerid mellett 2 mol szabad zsírsav keletkezik [Mukherjee, 1986]. A zsírsav mennyiségének visszaszorítására és a monoglicerid arányának a megnövelésére több módszert is kidolgoztak. Ricinus olaj *Rhizopus arrhizus* 1,3-sp-lipázzal való hidrolízisekor úgy növelték meg a termék monoglicerid tartalmát 23%-ról 65%-ra, hogy söt adagoltak a reakcióelegyhez, és így a keletkező szabad zsírsav csapadék formájában kivált a rendszerből, ami az egyensúlyt a termékképződés irányába tolta el [Flenker, 1990]. A hidrolízis során keletkező szabad zsírsavak alifás primer alkohollal, pl. 2-butanollal történő észterezésével is 70%-os monoglicerid hozamot sikerült elérni, és ezzel együtt a szelektivitás is megnőtt [Mazur, 1991].

1.9.2. Glicerín-monosztearát előállítása észterezéssel

Monogliceridet zsírsav és glicerín észterezési reakciójával is elő lehet állítani. Mivel egyensúlyi reakcióról van szó, a megfelelő reakciókörülmények beállításáról gondoskodni kell annak érdekében, hogy az enzim a szintézist katalizálja a hidrolízissel szemben [Khan, 1990]. Ahhoz, hogy megnöveljük a monoglicerid hozamot pl. az egyensúly eltolásával, a keletkezett vizet el kell távolítani. Alacsony víztartalmat lehet biztosítani molekulaszűrők reakcióelegyhez való adagolásával [Yamaguchi, 1991], illetve alacsony nyomáson kivitelezett reakcióval [Miller, 1988]. Az egyensúly eltolását eredményezi és így javítja a szelektivitást a glicerín hordozó anyagra való adszorpciója is [Berger, 1993], valamint a keletkezett monoglicerid eltávolítása a rendszerből [van der Padt, 1993].

Az alkalmazott lipáz is befolyásolja a keletkezett termék minőségét. *Aspergillus niger* és *Rhizopus delemár* a glicerín sn-1 illetve sn-3 helyzetű OH-csoportját észterezik, ami regioszelektív reakciót tesz lehetővé. A *Geotrichum candidum* és a *Penicillium cyclopium* lipázok csak a hosszú szénláncú zsírsavak észterezését katalizálják [Tsujioka, 1977].

A hőmérséklet is hatással lehet a monoglicerid tartalomra és hozamra egyaránt, valamint befolyásolhatja a kiindulási szubsztrátok oldhatóságát az oldószerben. Monosztearát szintézisét több különböző hőmérsékleten (20 – 70 °C) vizsgálták, és megállapították, hogy a legnagyobb, kb. 85% monoglicerid hozamot 50 °C-on nyerték, ugyanakkor az enzim (Novozym 435) még 70 °C-on is stabilnak bizonyult [Yang, 2003].

Észterezés során gondot jelent a zsírsavas és az alkoholos fázisok megfelelő érintkeztetése. Erre több megoldást is kidolgoztak. Egyik lehetséges alternatíva a megfelelő szerves oldószer alkalmazása, amelyben mind a zsírsav, mind a glicerín jól oldódik, és így homogén reakcióelegyet kapnak. További befolyásoló tényezőnek számít a kiválasztásnál az enzim aktivitása, mely nemcsak az oldószertől, hanem a szubsztrátoktól és az enzimkoncentrációtól is függ. Mivel a lipázok a legnagyobb aktivitást a határfelületen mutatják, célszerű rögzített enzimet használni [van der Padt, 1990]. Az alkalmazott enzim is befolyásolhatja az oldószerválasztást. Míg a *Rhizopus arrhizus* lipáz aktívnak bizonyult acetóban [Bell, 1978], addig a *Mucor miehei* lipáz semmilyen aktivitást nem mutatott ebben az oldószerben [Miller, 1988]. További megfigyelések eredménye az is, hogy az alkalmazott oldószer polaritása befolyásolja a keletkezett termék minőségét és a szelektivitását. Glicerín olajsavval való észtereztését elvégezték apoláros n-heptánban és poláros acetóban egyaránt. Míg az első esetben a monooleát tartalom 7.2% volt, addig a második esetben 68%-ot sikerült elérni alig 2 óra reakcióidő után [Otero, 1990]. Sztearinsavval történő észtereztésnél is vizsgálták a polaritás hatását, ahol szintén hasonló eredményre jutottak. Acetóban 2 óra reakció után 75% volt a monosztearát tartalom, míg hexánban csupán 25% [Yang, 2003]. Az alkalmazott enzim mindkét esetben *Candida antarctica* lipáz volt. Más kísérletek során is vizsgálták az oldószer polaritásának hatását. Itt a szubsztrát szilikagélre adszorbeált glicerín és olajsav, míg az enzim *Rhizomucor miehei* lipáz volt. Amíg tiszta hexánban csupán 6% volt a termék monooleát tartalma, addig azonos mennyiségű hexán és 2-metil-2-butanol keverékében ez az arány már 94%-ot ért el. Az oldószer polaritásának a növelése azonban a kezdeti reakciósebesség és a szubsztrát konverzió csökkenését is eredményezte [Bellot, 2001].

Alkohol és zsírsav kétfázisú emulziós rendszernél nincs oldószer, az enzim a határfelületen helyezkedik el oldott vagy rögzített formában [van der Padt, 1993].

Alternatív reakcióközeget jelentenek a fordított micellák, melyek szintén használhatók észterszintézre. A vizes fázis a micella belsejében található, amit szerves oldószer fázis vesz körül. Megoldást jelenthet abban az esetben, ha a glicerín rosszul oldódik a szerves oldószerben, mivel így az a micella belsejébe záródva helyezkedik el. Nagy határfelület alakul ki a két fázis között, így jó enzim-szubsztrát érintkezés valósulhat meg [Fletcher, 1987]. Ilyen közegben végeztek 1,3 specifikus lipázzal (*Rhizopus delemar*) regio szelektív észtereztést, mely során döntőrészt 1-monoglicerid keletkezett a várt 2-monoglicerid helyett [Hayes, 1991]. Ennek az oka, hogy az acilcsoport vándorol a mellette levő szabad OH-csoportra mindaddig, amíg be nem áll egy egyensúly 90% 1-monoacilglicerid és 10% 2-

monoacilglicerid arányban [Quinn, 1967; Jensen, 1976]. A zsírsav konverziója 50-60% körül volt. Több zsírsavval is elvégezték a kísérletet, és az eredményeket összehasonlítva sikerült egy reakciósebesség sorrendet felállítani: olajsav > kaprilsav > mirisztinsav = laurinsav > sztearinsav = palmitinsav [Hayes, 1991]. Nem-specifikus lipáz alkalmazásakor magasabb, 80-90%-os konverziót sikerült elérni [Fletcher, 1987].

Ahhoz, hogy a regioszelektív észterezés során magas monoglicerid tartalmat érjenek el, mindenféleképpen meg kellett oldani a glicerín apoláris oldószerben való oldását. A problémát a glicerín szilárd anyagra (szilikagél, celit) történő adszorpciójával küszöbölték ki. Termékként száraz port nyertek, melyet sikeresen szuszpendáltak az apoláros oldószerben (pl. dietil-éter - hexán elegy). A reakció lejátszódása után egy egyszerű szűréssel el lehetett távolítani mind a maradék glicerint, mind az enzimet. Ilyen módon legfeljebb 70%-os monoglicerid tartalmú terméket lehetett elérni, mivel nagyobb koncentrációnál már az 1(3)-monoglicerid bizonyult jobb szubsztrátnak az 1,3-szelektív lipáz számára [Berger, 1993].

1.10. Célkitűzések

A vonatkozó irodalom áttekintése után kettős célt tűztem ki magam elé. Egyrészt a lipáz enzimek és a reakcióközeg kölcsönhatásának további, részletes vizsgálatát a 2-szubsztituált propionsavak enzimkatalitikus enantioszelektív észterezésének, mint tesztreakciónak az alkalmazásával. Ennek a munkának a pénzügyi kereteit az elnyert OTKA pályázatok, tartalmát pedig a jóváhagyott kutatási program adta. Ebben középpontban állt a reakcióközeg víztartalmának tanulmányozása a lipáz enzim aktivitására, szelektivitására és stabilitására. Megfelelő módszereket kell találni a reakcióelegyben a vízkoncentráció helyett a vízáktivitás beállítására illetve a reakcióban keletkező víz folyamatos eltávolításával a víztartalom, ezen keresztül a vízáktivitás állandó értéken tartására. Látható, hogy az oldószerterméknökség adta lehetőségek csak részben valósulhatnak meg a sok esetben hasznos, de illékonyosságuk és tűzveszélyességük miatt sokszor korlátozottan alkalmazható szerves oldószerek használatával. Meg kell vizsgálni, hogy oldószermentes rendszerben (az egyik, az enzimre és a környezetre kevésbé káros reagens feleslegében) végzett reakciókkal mennyire lehet kiküszöbölni a szerves oldószerek hátrányait, illetve milyen új, környezetre kevésbé káros „zöld” oldószerek alkalmazhatók az enzimkatalitikus észterezésekben.

A különböző enzimek ugyanabban a szerves oldószerben eltérő módon viselkedhetnek. Sokszor egymásnak ellentmondó eredményekről szól a szakirodalom arra vonatkozólag, hogy a szerves oldószerek miként befolyásolják a *Candida rugosa* lipáz enzim

katalitikus aktivitását, stabilitását és enantioszelektivitását. Többen felvetik annak lehetőségét, hogy nem csupán az oldószerek fizikai-kémiai tulajdonságai, hanem azok kémiai szerkezete is közvetlenül meghatározó szerepet tölthet be az enzimek működésében.

Az oldószermérnökség keretein belül maradva, a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitását és enantioszelektivitását kívántam összehasonlítani különböző szerves oldószerekben és ionos folyadékokban. Kapcsolatot kerestem az oldószerek fizikai-kémiai tulajdonságai és az enzim aktivitása, enantioszelektivitása között. Királis oldószerek segítségével vizsgálni kívántam, hogy az oldószer és az enzimmolekula között a fizikai-kémiai kölcsönhatásokon túl kialakulhat-e valamiféle szorosabb, más jellegű kölcsönhatás is.

A másik kitűzött cél az alapkutatási eredmények hasznosítása és ehhez megfelelő együttműködő partner biztosítása. A hasznosítást elsősorban a természetes (bio)anyagok előállítása terén kívántam megvalósítani, ahol a Bevezetésben említett UNDP megbízásból fakadó, a mezőgazdasági hulladékok biotechnológiai hasznosítását célzó projekt eredményeit is fel lehet használni. Céлом így kétszeresen is szolgálja a környezetvédelmet: egyrészt hulladék anyagokat használ kiindulási anyagként, másrészt olyan folyamatos, integrált rendszerű hulladékszegény vagy hulladékmentes biokatalitikus eljárások kialakítása a cél, ahol az oldószermérnökség ismereteit hasznosan lehet alkalmazni a vegyészmérnöki tudomány területén. A megbízók által kitűzött feladatok megoldása mellett céлом a munka tudományos igényű kezelése, szükség esetén többletfeladatok beiktatása, hogy a miértekre is választ kapjak.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Anyagok

2.1.1. Enzimek és vegyszerek

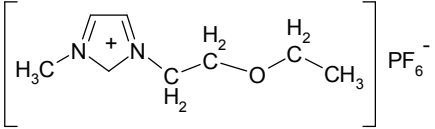
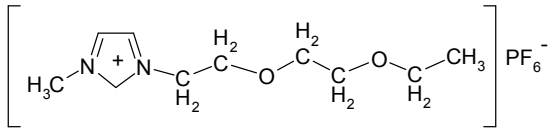
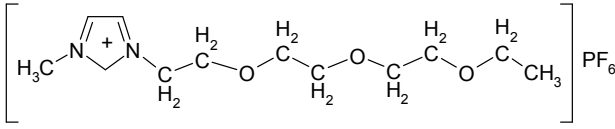
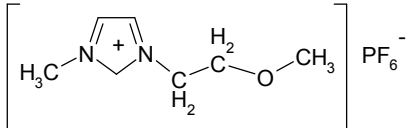
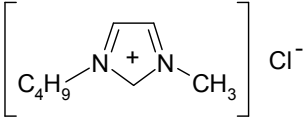
A kísérleti munka során felhasznált legfontosabb enzimeket és vegyszereket a könnyebb áttekinthetőség érdekében táblázatosan foglalom össze (2.1. és 2.2. táblázatok).

2.1. táblázat: A kísérletek során felhasznált enzimek és reagensek.

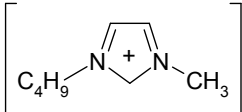
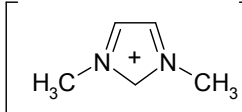
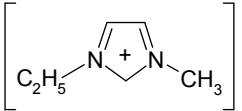
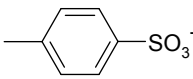
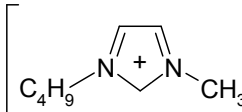
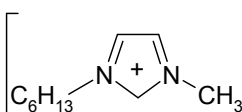
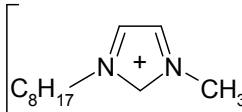
Megnevezés	Minőség	Gyártó, forgalmazó
<i>Candida rugosa</i> , korábbi nevén <i>Candida cylindracea</i> lipáz liofilizált enzim (E.C.3.1.1.3.)	Névleges aktivitás: 943 U/mg	Sigma-Aldrich Kft., Budapest
<i>Candida antarctica</i> lipáz B (CALB) rögzített enzim Novozym 435® (E.C.3.1.1.3.)	Névleges ktivitás: 7000 µmol PLU/g	Novo Nordisk, Basvaerd, Dánia
(<i>R,S</i>)-2-klór-propionsav, (<i>R,S</i>)-2-bróm-propionsav	analitikai reagens	Merck Kft., Budapest
(<i>R,S</i>)-2-metoxi-propionsav (<i>R,S</i>)-2-etoxi-propionsav (<i>R,S</i>)-2-propoxi-propionsav (<i>R,S</i>)-2-izopropoxi-propionsav (<i>R,S</i>)-2-fenoxi-propionsav	>98% (GC)	197873-as számú magyar szabadalom (Dukai, 1989)
Természetes ecetsav	99.5%	Scharlau Chemie S. A. Barcelona
Ecetsav	>98%	Spektrum 3D Kft., Debrecen
Természetes etanol	94.6%	Győri Szeszgyár és Finomító Rt.
Etanol	>99.7%	Spektrum 3D Kft., Debrecen
n-Propanol	analitikai reagens	Reanal Rt., Budapest
i-Butanol	analitikai reagens	Reanal Rt., Budapest
i-Pentanol (Izoamil-alkohol)	>98%	Spektrum 3D Kft., Debrecen
Glicerín	99.5%	Spektrum 3D Kft., Debrecen
Olajsav	99.9%	Reanal Rt., Budapest
Sztearinsav	≥97.0%	Merck Kft., Budapest
Kozmaolaj	*	Győri Szeszgyár és Finomító Rt.

*A felhasznált nyers kozmaolaj összetétele a következő volt: 4.1% etanol, 8.7% n-propanol, 32.7% i-butanol, 42.3% i-pentanol és 12.2% víz. Tisztítása filmbepárlóban történt.

2.2. táblázat: A mérések során felhasznált ionos folyadékok neve, rövidítése, szerkezeti képlete, tisztasága, gyártója.

Név	Rövidítés	Szerkezeti képlet	Tisztaság	Gyártó
1-(2-ETOXI-ETIL)-3-METIL-IMIDAZOLIUM- HEXAFLUOR-FOSZFÁT	VACEM42		> 98%	PE MÜKKI, Veszprém
1-{2-[2-(2-ETOXI)-ETOXI]-ETIL}-3-METIL- IMIDAZOLIUM-HEXAFLUOR-FOSZFÁT	VACEM44		> 98%	
1-[2-{2-[2-(2-ETOXI)-ETOXI]-ETOXI}- ETIL]-3-METIL-IMIDAZOLIUM- HEXAFLUOR-FOSZFÁT	VACEM47		> 98%	
1-(2-METOXI-ETIL)-3-METIL- IMIDAZOLIUM-HEXAFLUOR-FOSZFÁT	VACEM58		> 98%	
1-BUTIL-3-METIL-IMIDAZOLIUM-KLORID	[bmim]Cl		>98%	Merck KGaA., Darmstadt, Németország

2.2. táblázat (folytatás): A mérések során felhasznált ionos folyadékok neve, rövidítése, szerkezeti képlete, tisztasága, gyártója.

Név	Rövidítés	Szerkezeti képlet	Tisztaság	Gyártó
1-BUTIL-3-METIL-IMIDAZOLIUM-TETRAFLUOR-BORÁT	[bmim]BF ₄	 BF ₄ ⁻	>98%	Solvent Innovation GmbH, Köln, Németország
1,3-DIMETIL-IMIDAZOLIUM-DIMETIL-FOSZFÁT	[m ₂ mim]PO ₄ (CH ₃) ₂	 (CH ₃) ₂ PO ₄ ⁻	>98%	
1-ETIL-3-METIL-IMIDAZOLIUM-TOLUOLSZULFONÁT	[emim]tosy	  SO ₃ ⁻	>99%	Ionic Liquids Technologies GmbH & Co KG, Denzlingen, Németország
1-BUTIL-3-METIL-IMIDAZOLIUM-HEXAFLUOR-FOSZFÁT	[bmim]PF ₆	 PF ₆ ⁻	>99%	
1-HEXIL-3-METIL-IMIDAZOLIUM-HEXAFLUOR-FOSZFÁT	[hmim]PF ₆	 PF ₆ ⁻	>99%	
1-METIL-3-OKTIL-IMIDAZOLIUM-HEXAFLUOR-FOSZFÁT	[omim]PF ₆	 PF ₆ ⁻	>99%	

A mérések során felhasznált egyik enzim a *Candida antarctica* lipáz B (CALB) volt, melyet immobilizált formában alkalmaztam. Kereskedelmi forgalomban neve: Novozym 435® (Novo Nordisk, Basvaerd, Dánia). A Nemzetközi Enzimbizottság által a következő besorolást kapta: triacilglicerol-hidroláz, E.C. 3.1.1.3., tehát a hidroláz enzimek osztályába tartozik. Aktivitása 7000 $\mu\text{mol PLU/g}$. (Egy propil-laurát egység (PLU) a definíció szerint az az érték μmol -ban kifejezve, amennyi n-propil-laurát keletkezik szabványos körülmények között laurilsav n-propil-alkohollal való észterezésekor 15 perc után, atmoszférikus nyomáson.) Víz tartalma: 1-2%.

A másik alkalmazott enzim, a *Candida rugosa* lipáz volt liofilizált formában, amely szintén triacilglicerol-hidroláz (E.C. 3.1.1.3.). Aktivitása 943 U/mg. (Egy egység (U) definíció szerint az az érték μmol -ban kifejezve, amennyi zsírsav keletkezik szabványos körülmények között olívaolajból, triglicerid hidrolízissel 1 óra alatt, 7.2 pH-n, 37 °C-on, 30 perc inkubációs idő után).

A kísérletekben felhasznált nagyszámú többi oldószer, reagens és gázkromatográfiás standard mind analitikai tisztaságú volt, gyártóik megegyeztek a többi, felsorolt vegyszer gyártóival.

2.1.2. Membránok

A pervaporációs mérések során tesztelt és felhasznált membránlapok típusait, jellemzőit, beszállítóit az alábbiakban sorolom fel.

Pervaporációban tesztelt hidrofil lapmembránok:

- Pervap 2205, Sulzer Chemtech GmbH, Winterthur, Svájc,
- Pervap 2202, Sulzer Chemtech GmbH, Winterthur, Svájc,
- Pervap 2201 Sulzer Chemtech GmbH, Winterthur, Svájc,
- CMC-VP-43, CM-Celfa Membrantrenntechnik AG, Seewen, Svájc,
- CMC-CF-23, CM-Celfa Membrantrenntechnik AG, Seewen, Svájc.

Pervaporációban tesztelt hidrofób lapmembránok:

- PV 20063, Beroplan GmbH, St. Ingbert, Németország,
- Pervap 2255-50, Sulzer Chemtech GmbH, Winterthur, Svájc,
- Pervap 2256, Sulzer Chemtech GmbH, Winterthur, Svájc,
- Pervap 1060, Sulzer Chemtech GmbH, Winterthur, Svájc,
- 20 μm poli(oktil-metil-sziloxán), poli(etilén-imid) hordozón (POMS/PEI), Beroplan GmbH, St. Ingbert, Németország,

- Poli(dimetil-sziloxán) poli(akril-nitril) hordozón (PDMS/PAN), Beroplan GmbH, St. Ingbert, Németország,
- Metcell Starmem 120, poliimid, vágási érték: 200 Dalton, Membrane Extraction Technology LTD, London, UK,
- Metcell Starmem 228, poliimid, vágási érték: 280 Dalton, Membrane Extraction Technology LTD, London, UK.

2.2. Kísérleti módszerek, eljárások

2.2.1. Az (R,S)-2-szubstituált-propionsavak és az 1-butanol észterezési reakciójának vizsgálata

2.2.1.1. Reakció rázóinkubátorban

Az észterezési reakció egyensúlyát 50 ml-es reakcióelegyben vizsgáltam. Az (R,S)-2-klór-propionsavat (0.2 mol/l) és az 1-butanolt 1.2 mol/l) 50 ml-es mérőlombikba mértem be, majd oldószerrel jelig töltöttem a lombikot. Alapos elegyítést követően a reakcióelegyet 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba öntöttem, ebbe tettem a liofilizált *Candida rugosa* lipáz enzimet (0.2 g, 4 g/dm³). A reakcióelegyhez 0.135 µl desztillált vizet adtam, így biztosítva 0.15 mol/dm³-es vízkoncentrációt. A reakcióelegyet New Brunswick G24 rázó inkubátorban az adott hőmérsékleten temperáltam és 150 rpm-mel rázattam.

A további vizsgálatokhoz a modellreakciót öt különböző (R,S)-2-klór-propionsav és 1-butanol koncentráció mellett végeztem 10 ml-es reakcióelegy térfogatban. A szubsztrátok és az enzim vízáktivitásának beállítása külön edényben történt, a vízáktivitás beállítás fejezetnél leírt módon. A reakciókat az ismert vízáktivitású enzimpor hozzáadásával indítottam. A reakció előrehaladását a keletkezett (R)- és (S)-2-klór-propionsav-butil-észterek mennyiségének változásán keresztül követtem nyomon a reakcióelegyből adott időközönként vett minták gázkromatográfiás elemzésével (lásd 2.2.6.1. pont).

2.2.1.2. Vízádszorpciós izotermák felvétele

A vízádszorpciós izotermák meghatározásához az (R,S)-2-klór-propionsav, az 1-butanol és a n-hexán 5-5 ml-ét tartalmazó főzőpoharat ismert vízáktivitású telített sóoldatot tartalmazó nagyobb főzőpohárba helyeztem, és a párolgás megakadályozására a nagyobb főzőpohár száját lefedtem. Először 12, majd 16, 18 és esetenként 20 h elteltével vettem mintát, és Karl-Fischer titrátorral mértem az anyagok víztartalmát. Az apoláris jellegű n-hexán víztartalma 12

h elteltével 0.05% volt, és később már nem változott. A leginkább poláris tulajdonságú 2-klór-propionsav vízaktivitása ezzel szemben lassabban állt be állandó értékre.

2.2.1.3. Ionos folyadékok log P értékeinek meghatározása „rázóölcséres” módszerrel

Az oktanol-víz fázisegyensúly kialakulásának nyomonkövetéséhez az 1-oktanolos felső fázisnak mértem a víztartalmát. A víztartalom 21.1 h elteltével már nem változott, tehát kialakult a fázisegyensúly az 1-oktanol és a víz között. Ekkor az 1-oktanol víztartalma 4.83 % volt, ami megfelel a szakirodalomban fellelhető adatnak, mely szerint 298 K-en a víz oldhatósága 1-oktanolban 27 mol% [Schwarzenbach, 1993]. Az oktanol-víz elegyhez hozzáadva a vizsgálni kívánt ionos folyadékot, intenzív rázást követően UV-spektrofotométerrel az imidazolium gyűrű elnyelésére jellemző 211 nm-en meghatároztam az ionos folyadék megoszlását a két fázis között.

2.2.2. Etil-acetát előállítása vizsgálata

2.2.2.1. Reakció rázóinkubátorban

New Brunswick G24 rázóinkubátorban végrehajtott rázatott lombikos kísérletek során a reakcióelegy összetétele a következő volt: 0,786 mol/dm³ ecetsav, 0.5-5.0% víz, etanol feleslegben, változó molarányokban, [bmim]PF₆ ionos folyadékkal 5 cm³-re feltöltve. A kísérleteket Eppendorf-csövekben hajtottam végre 1-1 cm³ reakcióeleggyel, 150 rpm rázatósi intenzitás mellett, különböző hőfokokon. Az analízis céljából meghatározott időtartamok elteltével 1-1 Eppendorf-csövet kivettem a rázógépből, és meghatároztam a konverzió mértékét.

2.2.2.2. Reakció és pervaporáció integrálása

A reakcióelegy összetétele a pervaporációs mérések során a következő volt: 3.9% ecetsav, 8.7% etanol, 1.7% víz és 85.7% [bmim]PF₆. Az így összemért elegyet tartalmazó reaktoredényt csatlakoztattam a rendszerhez, beindítottam a keverést, a keringetést valamint a termosztálást. 15 perc eltelte után a reakcióelegy hőmérséklete már beállt az egyensúlyi értékre. A megfelelő mennyiségű enzim bemérésével (20 g/dm³) indítottam a reakciót. A reakció termékei közül a vizet hidrofíl, az etil-acetátot hidrofób membránt tartalmazó pervaporációs berendezéssel távolítottam el.

2.2.3. Izoamil-acetát előállítása vizsgálata

2.2.3.1. Reakció rázóinkubátorban

Rázatot lombikos kísérleteket hajtottam végre New Brunswick G24 rázóinkubátorban. A reakcióelegy általános összetétele a következő: 54.23 mmol izoamil-alkohol, 7.34 mmol ecetsav, 3.72 mmol víz, 2.83 mmol toluol és 1.38 g [bmim]PF₆ ionos folyadék és 38 mg Novozym 435 lipáz enzim. A reakcióelegyet 100 rpm intenzitással inkubátorban rázatva 60 °C-on 5 órán át a várható hozam 90-95%. Az optimalizálás során ezeket a paramétereket változtattam. Az oldószermentes közegben végzett vizsgálatokat a fenti, ionos folyadékot nem tartalmazó reakcióeleggyel végeztem el.

2.2.3.2. A komponensek megoszlásának vizsgálata

A sav és a termék megoszlásának vizsgálata során az alkoholos és ionos folyadékos fázis között 7.34 mmol ecetsavat vagy 2.24 mmol izoamil-acetátot inkubáltam 0.81 g (1,00 cm³) izoamil-alkohol és 1.38 g (1,00 cm³) [bmim]PF₆ kétfázisú keverékben 1 órán keresztül 30, 40, 50 és 60 °C-on erős rázatás mellett (200 rpm).

Az izoamil-alkohol [bmim]PF₆-ban való oldhatóságának mérése során 0.81 g izoamil-alkoholt inkubáltam 1.38 g [bmim]PF₆-ban 1 órán keresztül 30, 40, 50 és 60 °C-on, 200 rpm rázatási intenzitással. A két fázis szeparálása után az izoamil-alkoholt 4 x 5,0 cm³ n-hexánnal extraháltam ki az ionos folyadékos fázisból. A sav és az észter megoszlási hányadosának illetve az alkohol [bmim]PF₆ ionos folyadékban való oldhatóságának kifejezéséhez az alábbi egyenlettel számoltam [Swatloski, 2003]:

$$K_A = \left(\frac{[A]_{alkohol(e)} - [A]_{alkohol(u)}}{[A]_{alkohol(u)}} \right) \frac{V_{alkohol}}{V_{IF}},$$

ahol $[A]_{alkohol(e)}$ és $[A]_{alkohol(u)}$ a vizsgált komponens koncentrációja az alkoholos fázisban az extrakció előtt és után, $V_{alkohol}$ és V_{IL} az alkoholos és ionos folyadékos fázisok térfogata.

2.2.3.3. Az enzim hőstabilitásának vizsgálata

Az enzim inaktiválódás mértékének meghatározása a következőképpen történt: 10 mg enzimet bemértem az inaktiválódás szempontjából vizsgálni kívánt közeg 1 cm³-ébe. A közegben a vizsgálati hőmérsékleten erős rázatási intenzitás mellett (200 rpm) inkubáltam az enzimet. Az inkubálási idő végén a mintát 5 percig jeges vízbe raktam, majd az enzimet leszűrtem, acetonitrillel ultrahangos fürdőben mostam, majd szobahőfokon vákuum szárítószekrényben szárítottam. A mosás és szárítás hatékonyságát tömegméréssel

ellenőriztem. Az inaktiválódást két közegben vizsgáltam: kiindulási reakcióelegy ionos folyadékkal és ionos folyadék nélkül, mind a két közegben 3 hőfokon: 60, 70 vagy 80 °C-on, valamint minden egyes hőfokon 10 inkubálási időtartam után mértem aktivitást. Az inkubálási időt az inaktiválódás ütemének megfelelően változtattam.

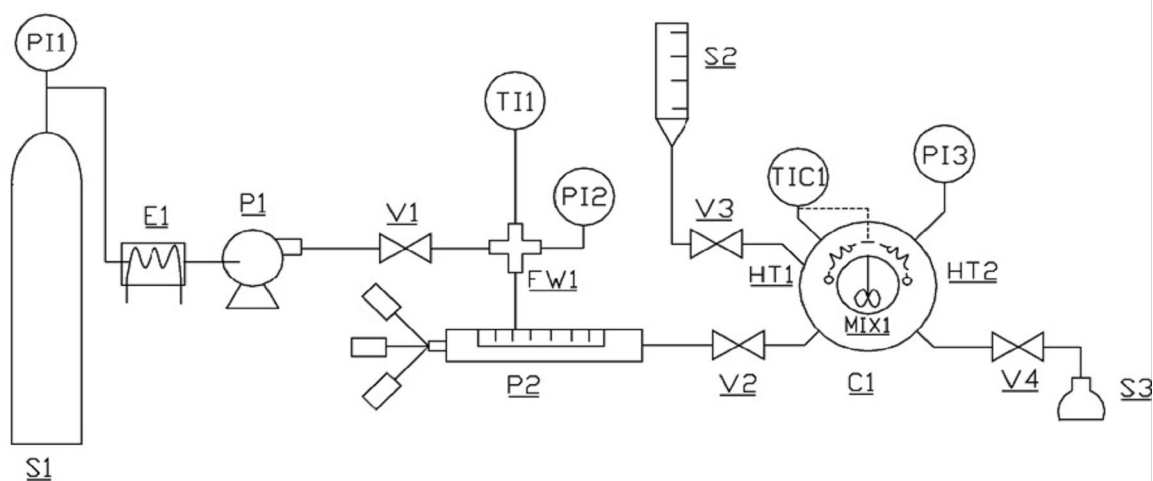
Ezután a részben vagy teljesen inaktiválódott enzim aktivitását, oldószermentes közegben 50 °C-on végrehajtott reakcióval mértem meg, és hasonlítottam a kontroll reakcióhoz. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 1.0% kezdeti víztartalom, 7.12 mmol izoamil-alkohol, 1.03 mmol ecetsav, 10 mg száraz enzim.

A kísérleti adatokból a modell paramétereit, sebességi állandókat a referencia hőmérsékleten és az aktiválási energiákat az Athena Visual Workbench (Stewart & Associates, Madison, Wisconsin, USA) szoftver segítségével számoltam.

A termostabilitás aktivitás-idő görbéinek elfogadhatósági kritériumai a következők voltak: egy görbe legalább hat pontot tartalmazzon a kezdeti pont mellett, a relatív aktivitás (a) hibaértéke 5% alatt legyen. A legjobb modell kiválasztásánál nemcsak a pontosság, hanem az egyszerűség is szempont volt. Tehát az adott statisztikai határon belül megfelelő, legegyszerűbb modellt választottam a számításokhoz.

2.2.3.4. Reakció szuperkritikus szén-dioxidban

A s.k. CO₂-ban végrehajtott kísérleteket egy nézőkével („view cell”) ellátott reaktorban végeztem. A teljes rendszer rajza a 2.1. ábrán, fényképei az F-5. ábrán láthatók. A CO₂ az S1 gázpalackból hűtés (E1) és nyomásnövelés után (P1) egy nyomás szabályozó egységen (P2) keresztül jutott a reaktortérbe (C1). A cella elektromos melegítővel (HT1, HT2), hőmérséklet szabályozóval (TIC1) és nyomás érzékelővel (PI3) volt felszerelve. A még nyitott reaktortérbe először az immobilizált enzimet helyeztem be, majd a nyomástartó fedő és 5 cm vastag biztonsági plexi lap rögzítése után a reakcióelegyet injekciós tűvel egy mintaadagoló nyíláson keresztül jutattam be. Ezután P2 segítségével a V2 szelepen keresztül nagy nyomású CO₂-ot eresztettem a reakciótérbe, amely kezdetben gáz állapotú volt, majd kritikus nyomása felett (73.8 bar) folyékonnyá vált. A reakció során a kevertetést egy szabályozható mechanikus keverő (MIX1) biztosította, a mintavétel egy 200 µl-es mintavevő hurokon (S2) keresztül történt. A reakció végén a nyomás csökkentése során a CO₂ a reakcióeleggyel egy vastag falú üvegedénybe áramlott, a reakcióelegy itt kondenzált, a CO₂ pedig az edényből kivezető csövön keresztül a levegőbe távozott.



2.1. ábra: Nagynyomású berendezés enzimkatalitikus észterezéshez (Maribori Egyetem).

S1: CO₂ gázpalack, E1: hűtő, P1: nagy nyomású membránpumpa, P2 nyomás szabályozó, C1: „nézőke”, MIX1: mechanikus keverő, HT(1,2): elektromos melegítő, PI(1,2,3): nyomás érzékelő, S2: mintavevő hurok, TI1: hőmérséklet érzékelő, TIC1: hőmérséklet szabályozó, V: nagy nyomású szelep, S3: leürítő edény.

2.2.4. Biokenőanyag előállítása vizsgálata

Az észterezési reakciókat New Brunswick G24 rázóinkubátorban hajtottam végre. A számos alkoholt tartalmazó kozmaolaj és az olajsav változó molarányú elegyének 25 cm³-ét különböző hőmérsékleteken, 150 rpm rázatási intenzitással keverttem. A reakcióelegy víztartalmát előzetesen 0.1%-ra állítottam be. A reakciót a kísérletenként változó mennyiségű Novozym 435 lipáz enzim hozzáadásával indítottam.

2.2.5. Glicerín-monosztearát előállítása vizsgálata

2.2.5.1. Reakció rázóinkubátorban

A reakcióelegyben a sztearinsav-koncentrációja 0.1 mol/dm³ volt, a glicerint a szükséges sztöchiometriai mennyiséghez képest különböző mólfeleslegekben adtam a savhoz, ennek célja részben a reakció egyensúlyának eltolása, másrészt a monoglicerid szelektivitás növelése volt. A reakciót az enzim (*Candida antarctica* lipáz, Novozyme 435) hozzáadásával indítottam. Az elegyet New Brunswick G24 rázógépben 150 rpm intenzitással rázattam adott hőmérsékleten. A reakció indítása után meghatározott időközönként 100 µl mintát vettem. A mintákat az eluensként alkalmazott tetrahidrofuránnal 15-szörös térfogatúra hígítottam, majd HPLC segítségével elemeztem.

2.2.5.2. HPLC analízis

A HPLC analízishez fordított fázisú gélpermeációs oszlopot alkalmaztam $0.5 \text{ cm}^3/\text{min}$ eluens áramlási sebesség mellett. A monosztearát hozamot a monosztearát kalibrációs egyenes segítségével határoztam meg. A diglicerid hozamot - feltételezve azt, hogy az alkalmazott glicerinfélesleg következtében triglicerid csak elhanyagolható mértékben keletkezik - a sztearinsav fogyásból illetve a monosztearát hozamból határoztam meg.

A sztearinsav és monosztearát kalibrációs egyenesek felvétele során a szórás 3% alatt volt. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztem és ezeket átlagoltam.

2.2.6. Általános módszerek

2.2.6.1. Gázkromatográfiás elemzés

Minden mérés során a különböző elegyek illékony komponenseinek minőségi és mennyiségi elemzését gázkromatográfiásan végeztem el. A mérések HP 5890A gázkromatográfon, lángionizációs detektorral (FID) a 2.3. táblázatban található paraméterekkel történtek.

Belső standard anyagként toluolt alkalmaztam, amelyet a kiindulási reakcióelegyhez adagoltam. A toluol kiválasztásánál szempont volt, hogy nem reagál a reakcióelegyek egyetlen komponensével sem, valamint a detektálható és retenciós sajátságai közel esnek a meghatározandó alkotók sajátságaihoz.

A mennyiségi elemzés többpontos kalibrációval történt, amely a belső standard módszer és a kalibrációs módszer kombinációjaként is felfogható. Ennek lényege, hogy változó tömegű/koncentrációjú meghatározandó komponens tartalmazó elegyet használtam a kalibráció meghatározásához, állandó belső standard tömeg/koncentráció mellett; vagy fordítva, a standard tömegét/koncentrációját változtattam, a komponensét pedig állandó értéken tartottam. Én az előbbi módszert választottam. Az A_i/A_s arányokat ábrázolva az m_i/m_s megfelelő adatpárok függvényében az origóból kiinduló, a lineáris tartományban kapott egyenes iránytangense adja meg a relatív érzékenységet.

Az egyes minták elemzése három párhuzamos mérés alapján történt, ekkor a hiba mértéke kielégítő pontosságú volt ($<3\%$). Négy párhuzamos mérést végezve a szórás nem csökkent számottevően. A kalibrációs egyenes felvétele során a illesztés szórásának négyzete megfelelő volt ($R^2=0.9993$).

A mennyiségi elemzés minden esetben az egyes reakcióelegyekből történt, tehát a számított hozam általában nem izolált hozamot jelent, de az egyszerűség kedvéért az értekezésben a hozam kifejezést használom.

2.3. táblázat: A gázkromatográfiás mérések paraméterei

Téma		2-szubsztituált- propionsav- észterek	etil-acetát	izoamil- acetát	biokenő- anyag
Minta- előkészítés	Extrakció	3×2 cm ³ n-hexán	3×3 cm ³ n-hexán	közvetlen bemérés	közvetlen bemérés
	Hígítás	nincs	nincs	× 10	× 10
Kolonna		FS-Lipodex E* 25 m × 0,25 mm × 0,2 μm	HP-FFAP* 30 m × 0,53 mm × 1,0 μm		
Gázáramok	N ₂ (cm ³ /min)	28	11	20	46
	H ₂ (cm ³ /min)	25	26	30	35
	Levegő (cm ³ /min)	230	263	300	120
Fejnyomás (kPa)		140	80	70	70
T _{injektor} (°C)		250	250	250	250
T _{detektor} (°C)		250	250	250	250
Kolonnatér	T _{kezdeti} (°C)	100	45	45	150 °C izotermikus
	t _{kezdeti} (min)	5	3	3	
	v _{fűtés} (°C/min)	10	10	10	
	t _{vég} (min)	180	200	145	
	T _{vég} (°C)	10	5	2	

* Gyártó, forgalmazó: Macherey-Nagel, Aachen, Németország

2.2.6.2. Savtartalom meghatározása titrálással

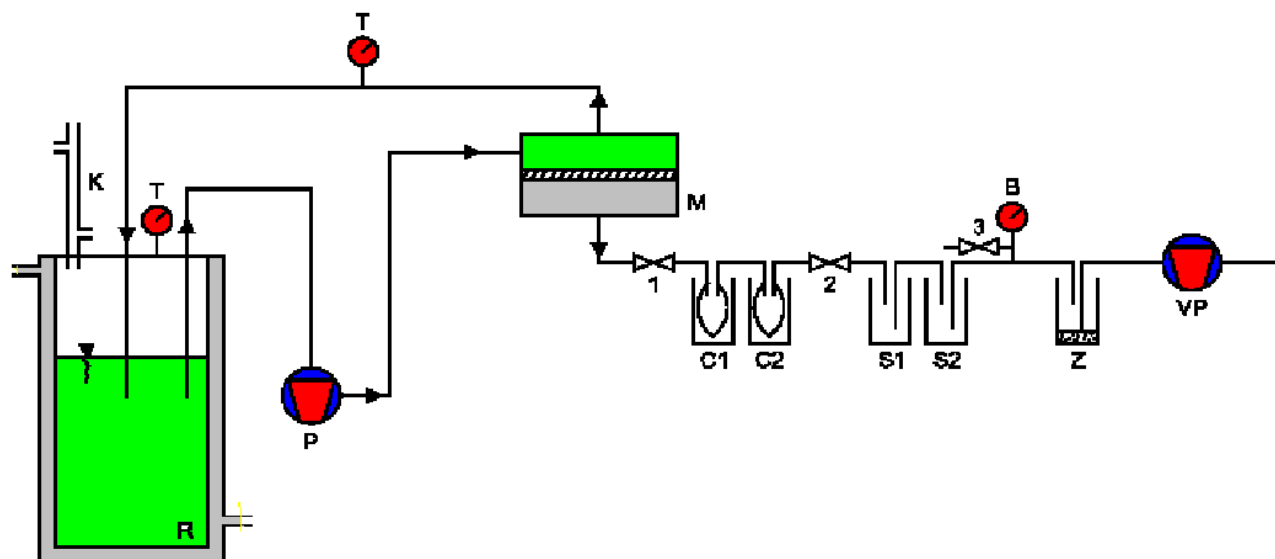
A savtartalmat hagyományos sav-bázis titrálással határoztam meg, amihez 0.1 mol/l-es etanolos kálium-hidroxid oldatot használtam fenolftalein indikátor mellett. A mérésekhez a következőképpen előkészelt etanolt alkalmaztam: 500 cm³ 96%-os etanolt refluxáltattam 1 órán át 3 g kálium-hidroxidon, hogy a lúgot fogyasztó anyagokat eltávolítsam, majd az alkoholt ledesztilláltam. Minden esetben legkevesebb 3 párhuzamos titrálást végeztem, ha a szórás mértéke túl nagy volt (≥5%), akkor további két párhuzamos mérést végeztem.

2.2.6.3. Víztartalom meghatározása

A kiindulási víztartalom optimalizálásához és megfelelő értékre való beállításához szükség volt a reakcióelegyek, valamint a kiindulási oldatok víztartalmának megállapítására. A mérés automata Mettler DL 35 Karl-Fisher titrátorral történt. Minden esetben legkevesebb 3 párhuzamos titrálást végeztem, ha a hiba mértéke túl nagy volt ($\geq 5\%$), akkor további két párhuzamos mérést végeztem.

2.2.6.4. Vízeltávolítás pervaporációval

A reakciókban keletkező víz folyamatos eltávolítását bizonyos esetekben a 2.2. ábrán és az F-6. fényképen látható pervaporációs berendezésben hajtottam végre. Az észterezést egy 200 cm³-es bioreaktorban (R) végeztem, amelyhez egy 12 cm² aktív felületű hidrofíl membránt tartalmazó pervaporációs egységet (M) csatlakoztattam. A reakcióelegyet perisztaltikus szivattyúval (P) keringtettem a membrán primer oldalán, míg a másik oldalon -80 °C-os szárazjéggel hűtött csapdákban (C1, C2) a permeátumot gyűjtöttem. A vákuumot (10 Hgmm=1.3 kPa) vákuum szivattyú (VP) állította elő. Ezenkívül nyomásmérő (B), valamint a vákuum pumpa védelmét szolgáló biztonsági csapdák (S1, S2, Z) kapcsolódtak még a rendszerhez.



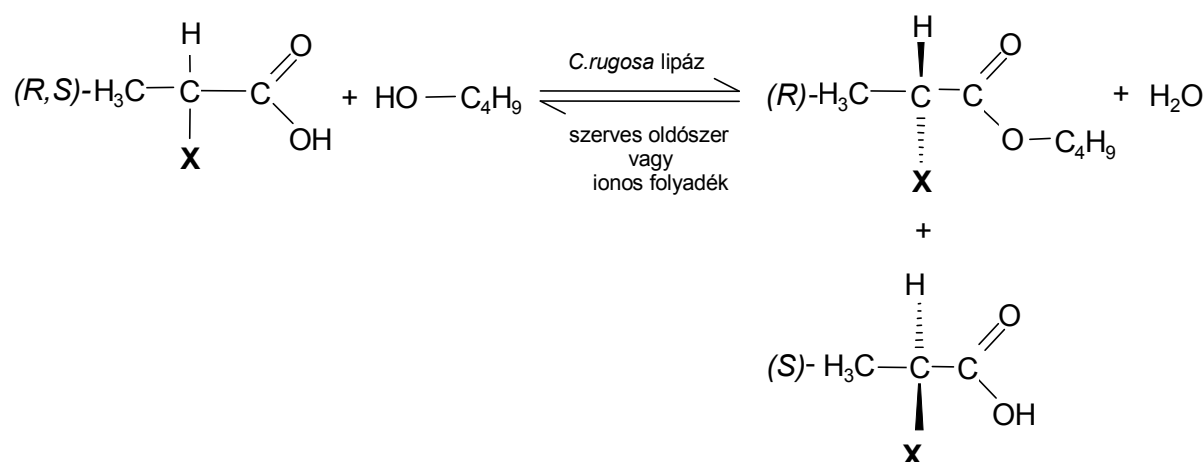
2.2. ábra: A vízeltávolításra szolgáló pervaporációs berendezés.

R – bioreaktor, T – hőmérő, K – hűtő, P – pumpa, M – membrán modul, C1, C2 – hűtött csapdák, S1, S2 – szilikonolajos csapdák, Z – zeolitos csapda, VP – vákuum pumpa, 1, 2, 3 – csapok, B – nyomásmérő

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. A 2-szubsztituált-propionsavak enzimkatalitikus enantioszelektív észterezése

A kandidátusi értekezésemben megkezdett munkát folytattam a 2-szubsztituált propionsavak enantioszelektív észterezésének vizsgálatával. Az ott elért és az irodalmi részben összefoglalt megállapításokra támaszkodva végeztem a korábban már vizsgált paraméterek tanulmányozását új szempontok szerint, és természetesen új vizsgálati módszerekre, új, eddig még nem vizsgált reakcióközegek és hatások tanulmányozására is sor került. A vizsgált reakció sémája a 3.1. ábrán látható.



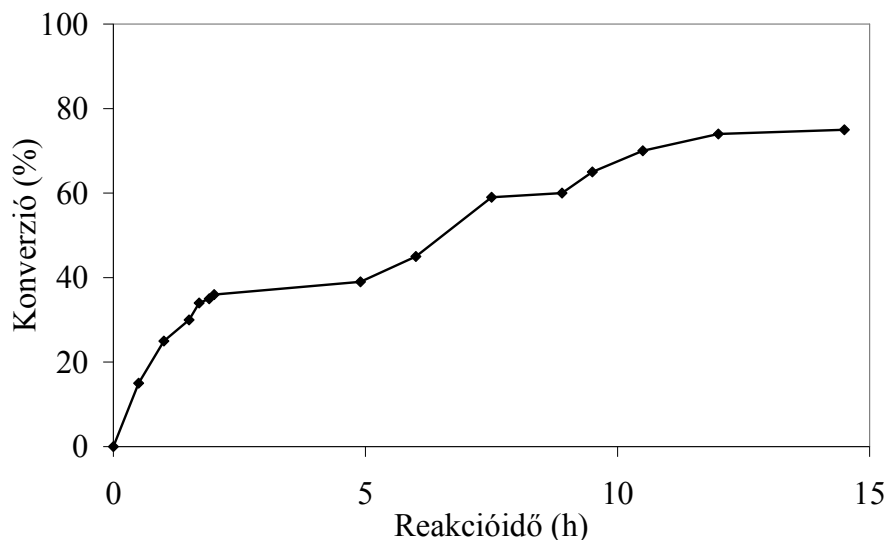
X: Cl-, Br-, MeO-, EtO-, PrO-, iPrO-, PheO-

3.1. ábra: A nem konvencionális közegekben vizsgált enantioszelektív enzimkatalitikus észterezési reakció.

3.1.1. Az (R,S)-2-szubsztituált-propionsavak és 1-butanol egyensúlyi észterezési reakciója [8, 15]

Korábbi munkáimban még nem vizsgáltam a reakció egyensúlyát, megelégedtem egy-egy paraméternek a hozamra vagy enantioszelektivitásra való hatásának tanulmányozásával. A szakirodalomból ismert, hogy a *Candida rugosa* lipáz működésének feltétele, hogy a reakcióelegy tartalmazzon vizet. A tesztreakcióban viszont a víz az észterképződés egyensúlyát a hidrolízis irányába tolja el. Ezeket figyelembe véve alacsony, 0.15 mol/dm³-es kezdeti vízkoncentrációt állítottam be a reakcióelegyben. Az 1-butanolt hatszoros feleslegben alkalmaztam, ez szintén a termodinamikai egyensúlynak az észterképződés irányába való eltolását segíti. Annak érdekében, hogy a reakció egyensúlyi helyzetéről képet kapjak, az észterképződést 20 h-n keresztül követtem nyomon. A reakció mintegy 15 h alatt elérte az egyensúlyi helyzetet, ekkor a kiindulási (R,S)-2-klór-propionsavnak 74 %-a alakult át (3.2. ábra),

vagyis a teljes reakcióra az egyensúlyi konverzió 74%-os. Mivel racém 2-klór-propionsavból indultam ki, amely 50%-ban tartalmaz *(R)*-2-klór-propionsavat, az enantiomer arány meghatározása nélkül is előre látható, hogy az enantioszelektivitás nem lesz magas.



3.2. ábra: Az *(R,S)*-2-klór-propionsav konverziójának változása az időben.

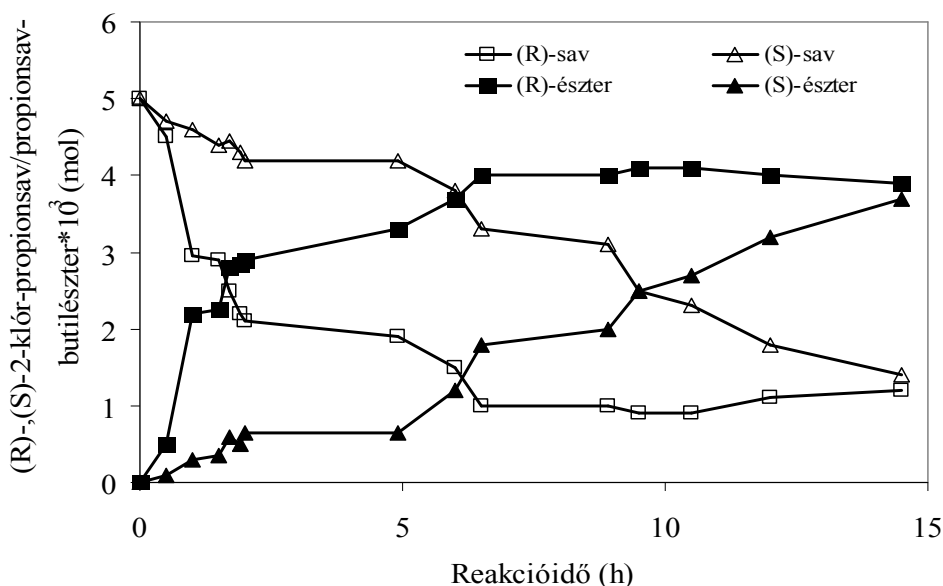
(oldószer: n-hexán, $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, kiindulási vízkoncentráció= 0.15 mol/dm^3)

Az egyensúlyi állandó ismerete akkor elengedhetetlen, amikor egy adott termék előállítása a cél, hiszen a hozam az egyensúlyi reakcióelegy összetételétől függ. Az egyensúlyi reakcióelegy összetétele alapvetően meghatározza a termék kinyerésére alkalmazható szeparációs módszereket is.

A disszertáció alapjául szolgáló kísérletek során a tesztreakció csupán egy eszközként szolgált arra, hogy a *Candida rugosa* lipáz enzim működését tanulmányozhassam különböző körülmények között. A reakciót legfeljebb addig követtem nyomon, amíg a gyors reakcióban az *(R)*-2-szubsztituált propionsav-butil-észter elérte egyensúlyi koncentrációját. Ezért a reakció teljes egyensúlyi állandójának meghatározásától eltekintettem, és a későbbiekben csupán az enantiomer arány meghatározásához szükséges, Chen és munkatársai által a rezolválási reakciókra definiált egyensúlyi állandót számoltam ki [Chen, 1986].

Mivel az *(R)*- és az *(S)*-2-klór-propionsav ugyanazon reakcióinak egyensúlyi állandói azonosak, K_{eq} kiszámításához elegendő megvárni, amíg a gyors reakció eléri az egyensúlyi helyzetét, vagyis az *(R)*-2-klór-propionsav-butil-észter koncentrációja nem növekszik tovább [Chen, 1986]. Az egyensúlyi állandó ekkor az *(R)*-2-klór propionsav és az *(R)*-2-klór-propionsav-butil-észter koncentrációinak hányadosaként számítható ki.

A 3.3. ábrán bemutatom a reagensek és termékek koncentrációjának változását a reakcióidő függvényében.



3.3. ábra. Az (R)- és (S)-2-klór-propionsav szubsztrátok valamint az (R)- és (S)-2-klór-propionsav-butil-észter termékek koncentrációjának változása az idő függvényében.

(oldószer: n-hexán, T=30 °C, kiindulási vízkoncentráció=0.15 mol/dm³)

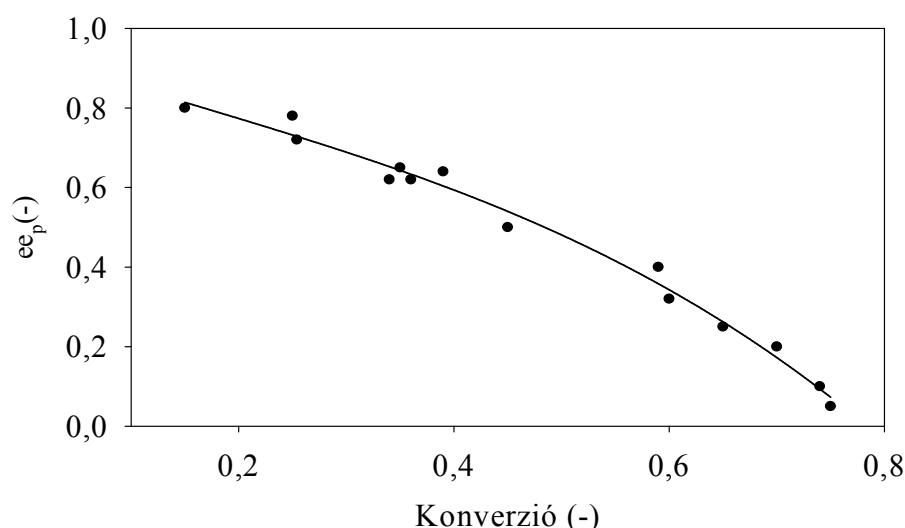
Az (R)-2-klór-propionsav-butil-észter koncentrációja 6.6 h elteltével érte el az egyensúlyi koncentrációját. Ekkor a reakcióelegyben az (R)-2-klór-propionsav-butil-észter koncentrációja 0.0788 mol/dm³, az (R)-2-klór-propionsav koncentrációja pedig 0.0212 mol/dm³ volt. A látszólagos egyensúlyi állandó (K'_{eq}) tehát:

$$K'_{eq} = \frac{[Rsav]_{eq}}{[Részter]_{eq}} = \frac{0.0212 \frac{mol}{dm^3}}{0.0788 \frac{mol}{dm^3}} = 0.27$$

A racém 2-klór-propionsav szubsztrát kiindulási koncentrációja 0.20 mol/dm³ volt, és az (R)-észter koncentrációja az egyensúlyi reakcióelegyben 0.0788 mol/dm³, vagyis az (R)-sav észterképződési reakciója az (R)-2-klór-propionsav 78.8%-os átalakulása esetén éri el az egyensúlyi állapotot. Az észterezési reakcióban folyamatosan képződő víz miatt a hidrolízis és az észterképződés sebessége ekkor egyenlővé válik, vagyis az (R)-2-klór-propionsav-butil-észter képződésének nettó sebessége zérus lesz. Így nem növekszik tovább az egyensúlyi állapot elérését követően az (R)-2-klór-propionsav-butil-észter mennyisége. Magára hagyva a reakciót, az (S)-2-klór-propionsav tovább reagál az alkohollal. 15.4 h reakcióidő elteltével az (S)-2-klór-

propionsav-butil-észter mennyisége sem nő tovább, ekkor a reakcióelegyben a koncentrációja 0.0734 mol/dm^3 . Szerves oldószerben azonos reakciókörülmények mellett racém szubsztrátum (*R*)- és (*S*)-enantiomereinek reakciójára az egyensúlyi állandó, ezáltal az enantiomerek egyensúlyi konverziója azonos. Jelen esetben az (*R*)-, és (*S*)-2-klór-propionsavak egyensúlyi konverziója 78.8 és 73.4%, tehát nem teljesen azonosak. Az eltérés az (*R*)- és (*S*)-2-klór-propionsav-butil észterek gázkromatográfiás mérésének hibájából adódhat [13].

A reakció enantioszelektivitásának meghatározásához a reverzibilis reakciókra levezett E-1.3. összefüggést illesztettem a konverzió-enantiomerfelesleg adatpontokra nem-lineáris regresszióval (3.4. ábra). A konverzió-enantiomerfelesleg adatpárookra $E=8$ függvény illeszthető, az enantioszelektivitás tehát a várakozásoknak megfelelően nem tekinthető magasnak. Arra a célra azonban mindenképpen megfelelt, hogy a későbbiekben az adott paraméterek kiváltotta változásokat követni lehessen.



3.4. ábra: Az enantiomer felesleg (ee_p) változása a konverzió függvényében az (*R,S*)-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezése során.

(oldószer: n-hexán, $T=30 \text{ }^\circ\text{C}$, kiindulási vízkoncentráció= 0.15 mol/dm^3)

3.1.2. A víztartalom hatása a *Candida rugosa* lipáz enzim működésére [6, 7, 15, 36, 37]

A reakcióelegyben jelen lévő víz mennyisége a tesztreakció szempontjából kettős jelentőségű. Annak érdekében, hogy a reakció folyamán a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása és enantioszelektivitása állandó legyen, az enzim környezetében állandó mennyiségű vizet kell biztosítani. Mivel a reakcióelegy összetétele a konverzió előrehaladásával változik, a reakcióelegy vízadszorpciós kapacitása sem azonos a reakció alatt. A vízaktivitás olyan mérőszám, amely a reakcióelegyben az enzim

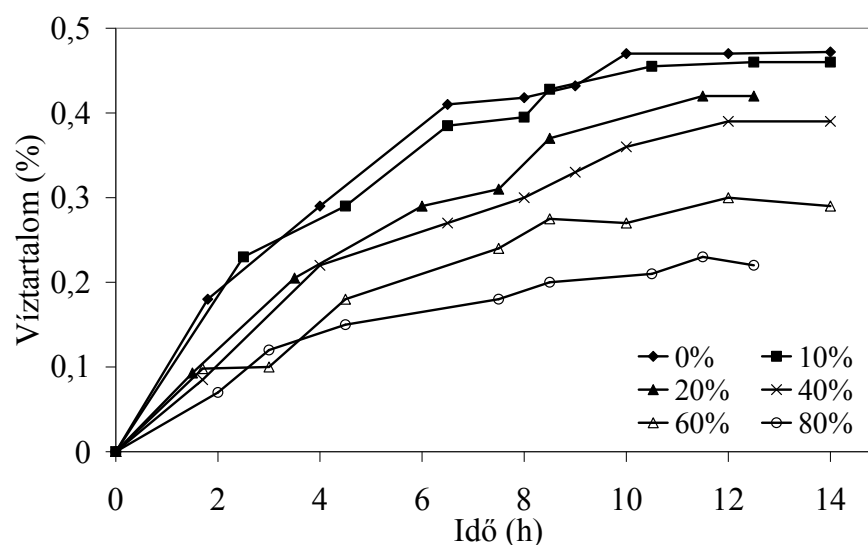
számára hozzáférhető víz mennyiségére utal. Poláris oldószerek nagyobb mennyiségű víz adszorpciójára képesek, míg apoláris oldószerekben kisebb mennyiségű víz elegendő ahhoz, hogy az oldószer telítődjön vízzel, és új, vizes fázis alakuljon ki. Ekkor a szerves oldószer vízaktivitása, $a_w=1$. Ez azt jelenti, hogy két, egymástól eltérő polaritású, azonos vízaktivitású oldószer víztartalma jelentősen eltérhet egymástól.

A fenti megfontolásokra alapozva a szakirodalom igyekszik állandó vízkoncentráció helyett állandó vízaktivitást biztosítani az enzimkatalitikus reakciókban. Olyan reakciókban, amelyek során nem képződik víz, a kiindulási reakcióelegy vízaktivitását állítják be, és elhanyagolják a reakcióelegy polaritásának megváltozása miatt bekövetkező vízaktivitás változást. Észterezési reakciók esetén, ahol a képződő víz következtében a reakcióelegy vízaktivitása jelentősen nő a konverzióval, állandó vízaktivitás kontrollt szükséges alkalmazni.

Annak eldöntésére, hogy a vízaktivitás beállítására szolgáló módszerek közül melyiket célszerű alkalmazni az *(R,S)*-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciójában, először azt vizsgáltam meg, hogyan változik a vízaktivitás a reakció folyamán. Ehhez *(R,S)*-2-klór-propionsav, 1-butanol, *(R,S)*-2-klór-propionsav-butil észter és *Candida rugosa* lipáz enzim felhasználásával *n*-hexán oldószerben olyan reakcióelegyeket állítottam össze, amelyek megfelelnek a 0, 10, 20, 40, 60 és 80% konverciónak akkor, ha a 0% konverciónak megfelelő kiindulási reakcióelegy 0.2 mol/l *(R,S)*-2-klór-propionsavat, 1.2 mol/l 1-butanolt tartalmaz, és az enzimkoncentráció 4 g/dm³. A koncentrációk kiválasztásánál a korábbi kinetikai vizsgálatok eredményeire támaszkodtam. A reakcióelegyek víztartalmát 3 Å zeolittal csökkentettem le, és Karl-Fischer titrálással ellenőriztem. A víztartalmuk 0.02 és 0.05% között változott. A reakcióelegyek vízaktivitását ezt követően LiCl ($a_w=0.11$), MgCl₂ ($a_w=0.33$), NaBr ($a_w=0.57$), KI ($a_w=0.69$), KCl ($a_w=0.84$) és K₂SO₄ ($a_w=0.97$) sók telített oldataival állítottam be 25 °C-on történő temperálás mellett (lásd 1.2. táblázat). A fázisegyensúly kialakulását a víztartalom mérésén keresztül követtem nyomon Karl-Fischer titrálással.

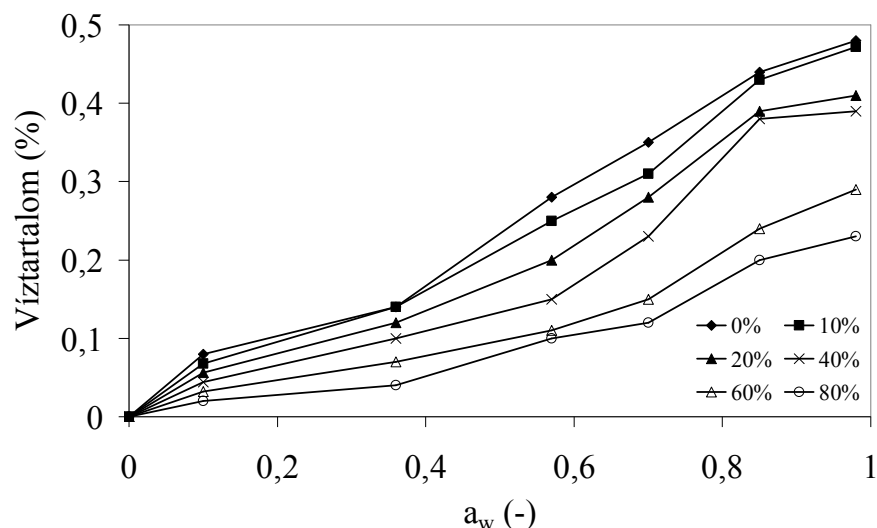
A reakcióelegyek fázisegyensúly kialakulása utáni víztartalma minden vízaktivitásnál csökkent a konverzióval. Ennek oka az lehet, hogy a kiindulási reakcióelegy tartalmazza a legnagyobb koncentrációban a 2-klór-propionsavat és az 1-butanolt, emiatt ez a leginkább poláros jellegű. Példaképpen az $a_w=0.97$ -re beállított reakcióelegyek vízadszorpcióját mutatom be az idő függvényében (3.5. ábra). A reakcióelegyek vízadszorpció izotermáit, a vízaktivitás és a vízkoncentráció közötti összefüggést pedig a 3.6. ábra mutatja. 0.97-es vízaktivitásnál a kiindulási reakcióelegy

0.48%, a 80% konverzióknak megfelelő összetételű reakcióelegy pedig 0.24% vizet tartalmazott. A vízadszorpció sebessége szintén arányos a n-hexán oldószer 2-klór-propionsav és 1-butanol-tartalmával, és 2.4-5.1 mg/h között változott (3.1. táblázat). A 10%-os konverzióknak megfelelő reakcióelegy vízadszorpciós kapacitása alig tér el a kiindulási reakcióelegytől. Ha tehát a kinetikai vizsgálatok eredményét alapul véve az (*R,S*)-2-klór-propionsavat 0.2 mol/l, az 1-butanolt pedig 1.2 mol/l koncentrációban alkalmazzuk, az észterezési reakció folyamán 10% konverzióig nem szükséges vízaktivitás kontrollt alkalmazni az állandó enzimaktivitás biztosítására. Az (*R,S*)-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezése tehát olyan speciális eset, ahol az inhibíciót okozó sav alacsony koncentrációja miatt a kiindulási reakcióelegy vízaktivitásának növekedése elhanyagolható 10%-os konverzióig. Állandó enzimaktivitás biztosítása érdekében tehát két út kínálkozik: a reakció egyensúlyi állapotának vizsgálata esetén folyamatos vízaktivitás kontroll szükséges, azonban ha a vizsgálat célja nem igényli tartamkísérlet végzését, elegendő a reakció elindítása előtt a vízaktivitást beállítani és 10%-os konverzióig tanulmányozni a reakciót.



3.5. ábra: A 0-80% konverzióknak megfelelő reakcióelegyek vízaktivitás beállítása telített K_2SO_4 sóoldattal ($a_w=0.97$) az idő függvényében 25 °C-on.

A n-hexánnál polárosabb oldószerek esetén az (*R,S*)-2-klór-propionsav és az 1-butanol kevésbé befolyásolja a reakcióelegy polaritását, és a képződő víz miatt csak kisebb mértékben növekszik a vízaktivitás a reakció folyamán. A reakcióelegy kiindulási vízaktivitása tehát a n-hexánnál polárosabb oldószerek esetén is csak kis mértékben változik, vagyis az enzim aktivitása 10% konverzióig állandónak tekinthető.



3.6. ábra: A 0, 10, 20, 40, 60 és 80%-os konverzióknak megfelelő reakcióelegyek vízadszorpció izotermája.

3.1. táblázat: A víztranszport sebessége 0-80% konverzióknak megfelelő reakcióelegyek K_2SO_4 telített sóoldattal ($a_w=0.97$) történő vízaktivitás beállítása során 25 °C-on.

REAKCIÓELEGY ÖSSZETÉTELE, KONV., %	VÍZTRANSZPORT SEBESSÉGE, mg/h
0	5.1
10	4.7
20	4.8
40	4.2
60	3.2
80	2.4

3.1.3. A szerves oldószerek hatása a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitására, enantioszelektivitására és stabilitására

3.1.3.1. Kapcsolat a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása, enantioszelektivitása és a szerves oldószerek fizikai-kémiai tulajdonságai között

A szakirodalomban ellentmondó eredmények találhatók arról, hogy a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása és enantioszelektivitása milyen módon függ az oldószerek fizikai-kémiai tulajdonságaitól. Ezek egy részében a különböző szerves oldószerekben tapasztalt eltérő enzimaktivitás és enantioszelektivitás nem tisztán az oldószerek hatását tükrözi. Ilyen eset például az, amikor igen eltérő polaritású oldószereket hasonlítanak össze vízaktivitás beállítás nélkül. Ezekben a kísérletekben valószínűleg az eltérő

vízaktivitás is közrejátszik az enzimaktivitás változásában. Előzetes kísérletekben a *Candida rugosa* lipáz enzim aktívnak bizonyult több ionos folyadékokban. Erre alapozva, az oldószerek hatásának vizsgálatába a hagyományos szerves oldószereken kívül ezeket az ionos folyadékokat is be kívántam vonni. A szerves oldószereket úgy választottam, hogy azok széles log P tartományt öleljenek át. A szakirodalomból az ionos folyadékok közül csak néhánynak a log P értéke volt ismeretes, ezért annak érdekében, hogy a log P skálán a [bmim]BF₄, [bmim]PF₆, és [omim]PF₆ ionos folyadékokat is el lehessen helyezni, meg kellett határozni a megoszlási hányadosukat n-oktanol - víz kétfázisú rendszerben.

3.1.3.2. Vízáktivitás beállítás helyett víztartalom beállítás [5,15, 34, 55]

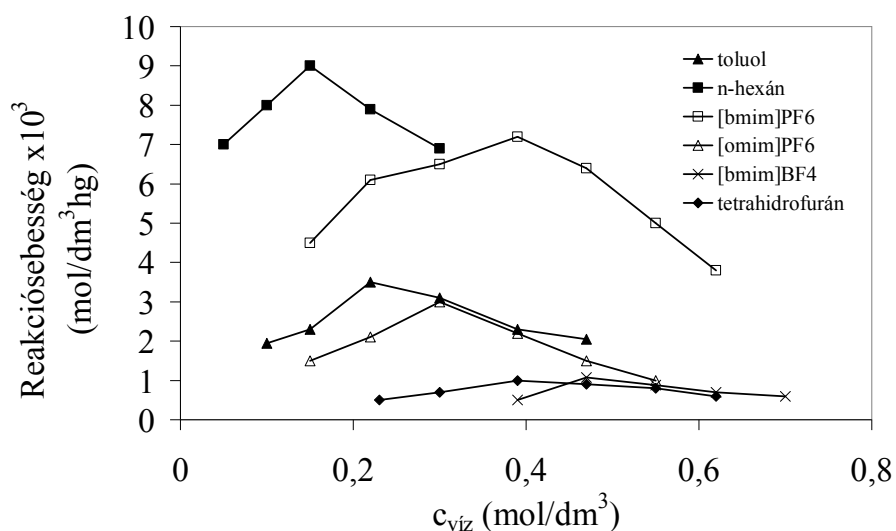
Az oldószereknek az enzim működésére gyakorolt valós hatásának tanulmányozása céljából a reakcióelegyekben azonos vízáktivítást szükséges biztosítani, hiszen csakis így kerülhető el a vízáktivitás különbségből eredő enzimaktivitás különbség. A megfelelő módszer kiválasztásakor azonban tekintetbe kell venni, hogy a [bmim]BF₄ vízzel elegyedő poláros oldószer, amelynél a sóhidrátpárok és a telített sóoldatokkal történő vízáktivitás beállítás akadálya lehet, hogy a sók oldódnak az ionos folyadékokban [Eckstein, 2002]. E helyett azt a tényt használtam ki, hogy a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása bármely oldószerben azonos vízáktivitás mellett maximális [Karr, 2003]. Az oldószerek polaritásának megfelelően ugyanaz a vízáktivitás eltérő víztartalom mellett alakul ki a különböző oldószerekben, vagyis eltérő víztartalom mellett lesz maximális az enzim aktivitását kifejező reakciósebesség vagy konverzió. A gondolatmenet megfordításából adódik a lehetőség: a kívánt optimális kezdeti vízáktivitás beállítható úgy, hogy megkeressük oldószerenként a maximális reakciósebességet biztosító kiindulási víztartalmat.

Természetesen egy adott vízáktivitás pontos beállításához végtelenül sok víztartalom mellett kellene mérni a reakciósebességet. E helyett minden oldószerben legalább öt különböző kiindulási vízkoncentrációt állítottam be. A reakciósebesség kiszámításához a 10%-os konverzióig vagy 5 h-n keresztül keletkezett (*R*)-, és (*S*)-2-klór-propionsav-butil-észterek mennyiségét vettem figyelembe. Annak érdekében, hogy az enantiomer arány kiszámításához szükséges egyensúlyi állandó meghatározható legyen, a reakciókat a gyorsan reagáló (*R*)-2-klór-propionsav-butil-észter egyensúlyi koncentrációjának eléréséig követtem nyomon szerves oldószerekben. Ionos folyadékokban ezzel szemben annyi reakcióelegyet kellett összeállítani, ahány

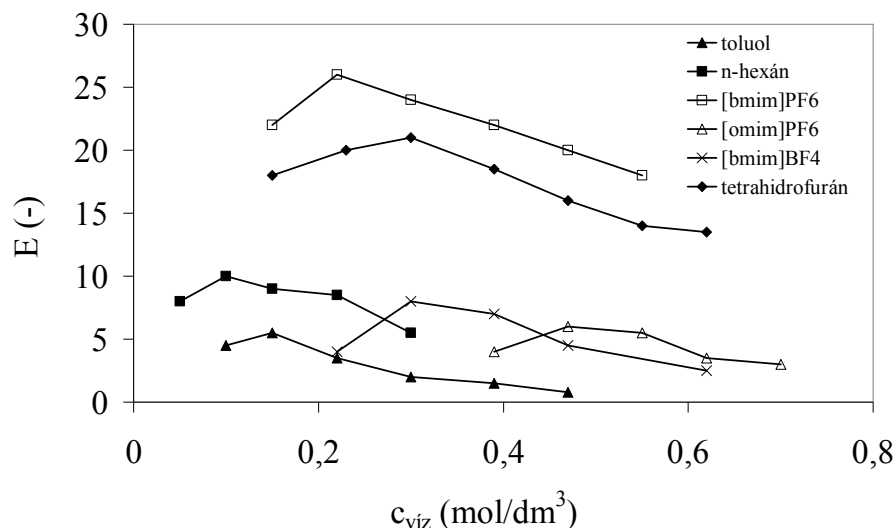
mintavétel történt, hiszen a GC-s elemzéshez az (*R*)- és (*S*)-2-klór-propionsav-butil-észtereket extrahálni kellett n-hexánnal az ionos folyadékból, majd ezt az extraktumot elemezni. Ez azt jelenti, hogy egyszerre 15 reakcióelegy került összeállításra, amelyekből a termékek extrakciója a mintavételi időpontoknak megfelelő időpontokban történt.

A reakciósebesség optimumgörbe szerint változott a víztartalom függvényében (3.7. ábra). A legnagyobb reakciósebességet 0.15 mol/dm³ vízkoncentráció mellett n-hexánban ($8.9 \times 10^{-3} \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) és 0.38 mol/dm³ vízkoncentrációnál [bmim]PF₆ ionos folyadékban tapasztaltam. Toluolban és [onim]PF₆ ionos folyadékban közel azonos volt az észterezési reakció sebessége ($3.2 \times 10^{-3} \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ és $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), míg a polárosabb karakterű tetrahidrofuránban és [bmim]BF₄-ben igen alacsony, $10^{-3} \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ sebességgel keletkeztek az észter termékek, és a reakció sebessége kis mértékű függést mutatott a vízkoncentrációtól.

A *Candida rugosa* lipáz enantioszelektivitása a vízkoncentráció függvényében szintén optimumgörbe szerint változott, értéke azonban kevésbé függött a vízkoncentrációtól, mint a reakciósebesség (3.8. ábra). Az enantioszelektivitás [onim]PF₆-ban és [bmim]PF₆-ban moderált (25 és 19), míg a többi oldószerben inkább alacsonynak tekinthető. A klasszikus szerves oldószerek közül n-hexánban volt tapasztalható a legmagasabb enantioszelektivitás (*E*=10).



3.7. ábra: A reakciósebesség változása a kiindulási vízkoncentráció függvényében.



3.8. ábra. Az enantioszelektivitás (E) változása a kiindulási vízkoncentráció függvényében.

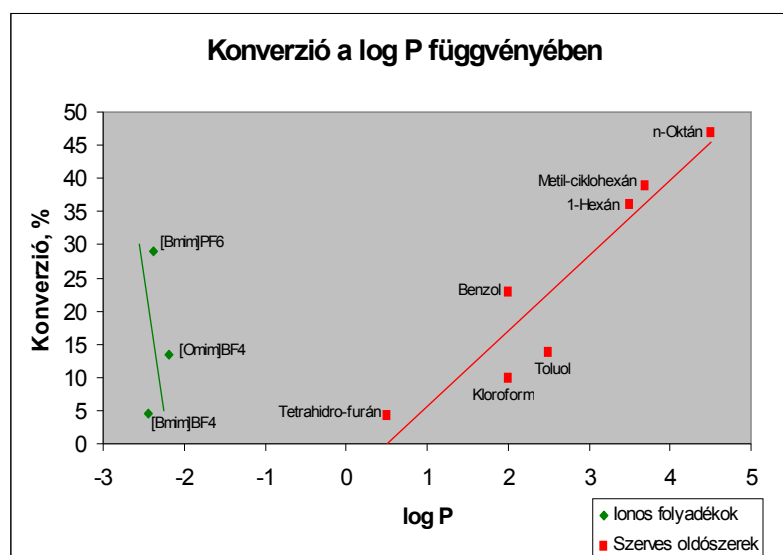
A 3.2. táblázatban összefoglaltam azokat a vízkoncentrációkat, amelyek mellett a maximális reakciósebesség ($c_{\text{víz}}(\text{konv})$) illetve enantioszelektivitás (E) ($c_{\text{víz}}(\text{E})$) elérhető. Mivel a *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása és enantioszelektivitása optimumgörbe szerint változott a vízaktivitással, és oldószertől függetlenül azonos vízaktivitás mellett a legnagyobb a reakciósebesség illetve az enantioszelektivitás, valószínűsíthető, hogy minden oldószerben a megfelelő $c_{\text{víz}}(\text{konv})$ vízkoncentrációt beállítva a vízaktivitás azonos lesz a reakcióelegyekben. Ehhez hasonlóan minden oldószerben a megfelelő $c_{\text{víz}}(\text{E})$ vízkoncentráció beállításával a reakcióelegyek vízaktivitása jó közelítéssel azonos lesz. Közvetett módon tehát a reakcióelegyekben kvázi azonos vízaktivitást sikerült beállítani sópárok vagy telített sóoldatok használata nélkül is.

3.2. táblázat: Konverzió és enantioszelektivitás az (R,S)-2-klór-propionsav észterezésében $c_{\text{víz}}(\text{konv})$ és $c_{\text{víz}}(\text{E})$ vízkoncentrációk esetén.

(T=30 °C, t=2 h)

OLDÓSZER	LOG P	$C_{\text{víz}}(\text{KONV})$ MOL/DM ³	KONVER- ZIÓ, %	E	$C_{\text{víz}}(\text{E})$ MOL/ DM ³	KONVER- ZIÓ, %	E
[Bmim]BF ₄	-2.44 ± 0.23	0.54	4.6	5	0.46	4.0	6
[Bmim]PF ₆	-2.38 ± 0.25	0.38	29.0	18	0.31	26.2	20
[Omim]PF ₆	-2.19 ± 0.24	0.31	13.4	24	0.23	8.9	25
Tetrahydrofuran	0.5	0.38	4.3	4	0.31	3.2	5
Toluol	2.5	0.23	13.9	3	0.15	10.1	5
n-Hexán	3.5	0.15	36.1	8	0.08	31.7	10

Az 1.1. ábrán bemutattam a konverzió függését a Reichardt-féle polaritástól *Pseudomonas capacia* lipáz esetén. Hasonló megfigyelést tehetünk a log P érték függvényében végzett vizsgálatokkor is. A 3.9. ábrán a log P függvényében mutatom be a vizsgált reakció során a konverzió változását különböző oldószerekben. Látható, hogy a log P értékek csökkenésével az elért konverzió csökken, s akárcsak a Reichardt-féle polaritás függvényében végzett összehasonlításnál, az erősen negatív log P tartományba eső ionos folyadékok esetében a log P csökkenésével nő, vagyis mindkét fajta vizsgálatnál egy minimum görbe szerinti összefüggést fedezhetünk fel [62].



3.9. ábra: A testreakció konverziójának függése az oldószerek log P értékétől.

3.1.4. A *Candida rugosa* lipáz enzim szubsztrátspecifikussága 2-szubsztituált propionsavak észterezési reakcióiban

A királis 2-szubsztituált propionsavak közül a 2-es szénatomon aril-szubsztituenst tartalmazó profének kiterjedt szakirodalommal rendelkeznek. Az irodalmi összefoglalóban bemutatott reakciókban igen magas enantioszelektivitással ($E > 100$) rezolválhatók. Korábbi munkámban [Gubicza, 1992] vizsgáltam különböző elektron akceptor/elektron donor szubsztituenseket tartalmazó királis propionsavak észterezését szerves oldószerekben. Ezekben az enantioszelektivitást az (*R*)- és (*S*)-2-klór-propionsavak kezdeti reakciósebességének hányadosaiként definiáltam. Az enzimaktivitást a 45%-os konverzió eléréséhez szükséges reakcióidővel jellemeztem, viszont a reakciókat nem állandó vízaktivitás mellett végeztem, ezért az enzim aktivitása sem volt azonos.

Jelen vizsgálatban célként tűztem ki, hogy a különböző méretű elektron donor és elektron akceptor szubsztituenseket tartalmazó királis 2-szubsztituált propionsavak

észterezésében az enzim aktivitását állandó vízaktivitás mellett hasonlítsam össze, valamint tartamkísérletekben meghatározom az észterezési reakciók egyensúlyi állandóit, majd ezek ismeretében az enantiomer arányt nemcsak szerves oldószerekben, hanem ionos folyadékokban is.

Az *(R,S)*-2-klór-propionsav észterezésében a reakciósebesség *n*-hexán és [bmim]PF₆ oldószerekben, az enantiomer arány pedig [onim]PF₆ és [bmim]PF₆ ionos folyadékokban volt a legmagasabb (3.2. táblázat). A szubsztituensek hatásának vizsgálatát *n*-hexánban és [bmim]PF₆ oldószerekben végeztem, mert ezekben ment végbe a legnagyobb sebességgel a 2-klór-propionsav észterezése 1-butanollal. Az észterezési reakciók során a 2-bróm-, 2-metoxi, 2-etoxi-, 2-propoxi-, 2-izopropoxi-, valamint 2-fenoxi-propionsavakat a 2-klór-propionsavhoz hasonlóan 0.2 mol/dm³ koncentrációban, az 1-butanolt pedig szintén hatszoros feleslegben alkalmaztam. A cél az volt, hogy a különböző szubsztituenseket tartalmazó királis propionsavak reakciósebességét hasonlítsam össze *n*-hexánban, majd pedig [bmim]PF₆ oldószerekben olyan kiindulási vízaktivitás mellett, amelynél az enantioszelektivitás maximumot mutatott. Ez alapján *n*-hexánban 0.08, míg [bmim]PF₆-ban 0.31 mol/dm³ kiindulási vízkoncentrációt állítottam be. Ezt követően az enzim hozzáadásával elindítottam az észterezési reakciót, és az észter termékek mennyiségéből kiszámoltam a reakciósebességet és az enantiomer arányt. Az egyensúlyi állandó meghatározásához *n*-hexánban a reakcióelegyekből 2-5 napon keresztül vettem mintát, amíg az *(R)*-2-propionát észter mennyisége már nem változott tovább.

Candida rugosa lipáz enzimmel az összes vizsgált sav esetében az *(R)*-enantiomer a gyorsan reagáló enantiomer. Az elektronszívó klór- és bróm szubsztituensek közül a nagyobb méretű bróm-szubsztituens esetében a reakciósebesség *n*-hexánban és [bmim]PF₆-ban is kisebb. *n*-Hexánban pl. 2 h elteltével az *(R,S)*-2-klór-propionsav konverziója 317 %, míg az *(R,S)*-2-bróm-propionsav konverziója 24.5% (3.3. táblázat). Az elektrondonor szubsztituenseket tartalmazó királis propionsavak reakciósebessége általánosan alacsonyabb, és szintén megfigyelhető, hogy a konverzió a szubsztituens méretével mindkét oldószerben csökkent. Az *(R,S)*-2-klór-propionsavhoz hasonlóan a bróm-, metoxi-, etoxi-, és propoxi-szubsztituenseket tartalmazó királis savak reakciósebessége *n*-hexánban kissé nagyobb, mint [bmim]PF₆ ionos folyadékban, azonban azonos nagyságrendű. Kivételt képez az elágazó láncú szubsztituenst tartalmazó *(R,S)*-2-izopropoxi-propionsav és az aromás szubsztituenst tartalmazó *(R,S)*-2-fenoxi-propionsav, ahol szintén mindkét oldószerben azonos nagyságrendű a

reakciósebesség, azonban [bmim]PF₆ ionos folyadékban kissé magasabb, mint n-hexánban. A vizsgált királis savak közül az (R,S)-2-fenoxi-propionsav reaktivitása a legalacsonyabb, ami valószínűleg az aromás fenoxi-szubsztituens által kialakított elektrosztatikus hatásoknak tulajdonítható.

3.3. táblázat: Az (R,S)-2-szubsztituált-propionsavak konverziója 30 °C-on, 2 h reakcióidőnél n-hexánban és [bmim]PF₆ oldószerben $c_{\text{viz}}(\text{E})$ vízkoncentrációk (3.2. táblázat) mellett.

SZUBSZTITUENS	KONVERZIÓ, %	
	n-hexán	[bmim]PF ₆
Klór	31,7	26,2
Bróm	24,5	20,5
Metoxi	29,2	21,3
Etoxi	21,6	17,7
Propoxi	17,5	15,0
Izopropoxi	10,0	10,8
Fenoxi	5,2	6,2

A lehető legmagasabb enantioszelektivitás elérése érdekében n-hexánban 0.08, míg a [bmim]PF₆-ban 0.31 mol/dm³ vízkoncentrációt kellett beállítani. Az enantiomer arány meghatározásához szükséges az egyensúlyi állandók ismerete, amit Chen és munkatársai által ismertetett módszer szerint határoztam meg [Chen, 1986].

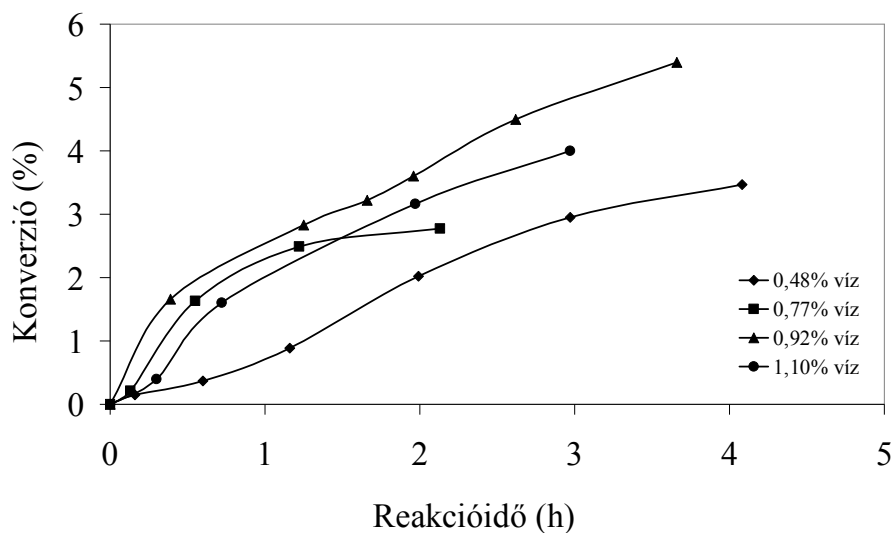
Az enantioszelektivitás a vizsgált racém 2-szubsztituált propionsavak észterezésekor n-hexánban 4 és 18, míg [bmim]PF₆-ban 10 és 29 között változott (3.4. táblázat). Az elektronszívó Cl-szubsztituensre nagyobb méretű Br-szubsztituensre cserélve az E enantioszelektivitás n-hexánban 10-ről 18-ra, míg [bmim]PF₆ oldószerben 20-ról 29-re változott. Elektrondonor szubsztituensek esetén ezzel szemben a szubsztituens méretével csökkent az enantioszelektivitás, és amíg az (R,S)-2-metoxi-propionsav észterezésében az E érték 16 volt, addig az (R,S)-2-fenoxi-propionsav észterezésében az E alacsony, mindössze 4 volt. [Bmim]PF₆ oldószerben az enantioszelektivitás több szubsztituens esetében is kétszerese volt a n-hexánban tapasztalt értékhez képest, és a E változása a szubsztituensek jellegének valamint méretének függvényében is hasonló volt a n-hexánban tapasztaltnak.

3.4. táblázat: Az (R,S)-2-szubsztituált-propionsavak enantioszelektivitása 30 °C-on n-hexánban és [bmim]PF₆ oldószerekben c_{víz}(E) vízkoncentrációk mellett (3.2. táblázat).

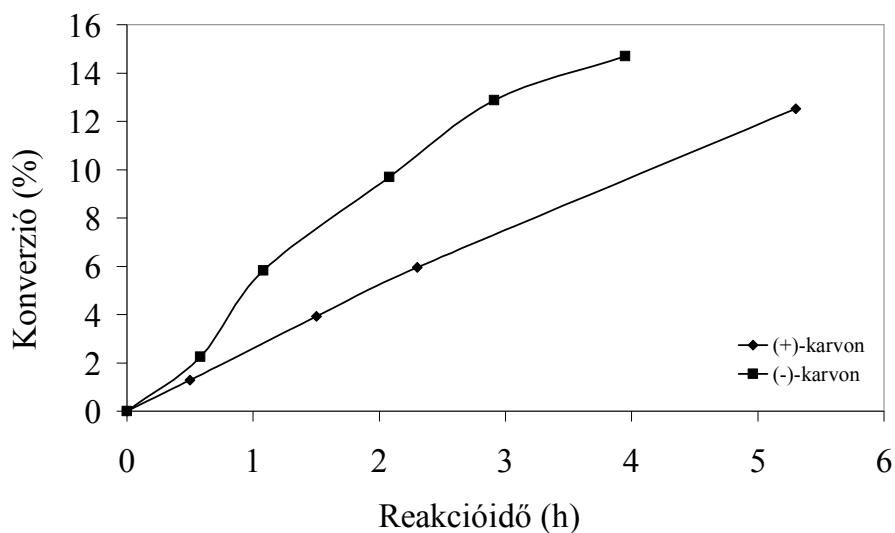
SZUBSZTITUENS	E, -	
	n-hexán	[bmim]PF ₆
Klór	10	20
Bróm	18	29
Metoxi	16	25
Etoxi	13	21
Propoxi	7	19
Izopropoxi	7	14
Fenoxi	4	10

3.1.5. Királis oldószer hatása a *Candida rugosa* enzim aktivitására és enantioszelektivitására [3, 30, 41].

A 2-klór-propionsav és a szerkezetileg hasonló savak észterezését szinte kizárólag akirális oldószerekben vizsgálták. Egyedül néhány racém alkohol *Pseudomonas capacia* lipáz enzimmel katalizált átészterezésére találtam irodalmi utalást (Ottolina, 1993). A vizsgálatokat ezért kiterjesztettem az észterezési reakcióra oldószerként (-), (+) és racém karvont alkalmazva. Ismerve a karvon alacsony log P értékét (0.35), várható volt, hogy az elért hozamok alacsonyabbak lesznek, mint például a tízszer nagyobb log P értékű (3.5) n-hexánban. A várakozásnak megfelelően a kezdeti reakciósebesség csak mintegy ötöde volt a n-hexánban kapott értéknek (3.10. ábra). Mivel a karvon polárosabb oldószer, mint a n-hexán, a reakcióelegyben jelenlevő vízből lényegesen többet megköt, így az enzim környezetében a víz koncentráció kisebb. Ez okozza, hogy a n-hexánban mért 0.2 - 0.3% helyett itt 0.92% kiindulási víztartalom mellett mértük a legnagyobb konverziót, ami 3.5 h reakcióidő után sem érte el a 6%-ot. Feltételeztem, hogy a királis oldószer molekulái eltérő módon lépnek kapcsolatba az enzim aktív centrumával. Amennyiben az oldószer két optikai izomerje közül az egyik erősebben kapcsolódik az enzim kötő helyéhez, akkor az enzim hozzáférhető szabad aktív centrumainak száma, így az enzim aktivitása csökkenhet. A *Candida rugosa* enzim aktivitását megvizsgáltam (-)- és (+)-karvon oldatban is (3.11. ábra). Az eredmények jobb kiértékelhetősége céljából ezekben a kísérletekben a felhasznált enzim mennyiségét megkétszereztem. Azt tapasztaltam, hogy a konverzió (-)-karvonban lényegesen magasabb volt, mint (+)-karvonban.

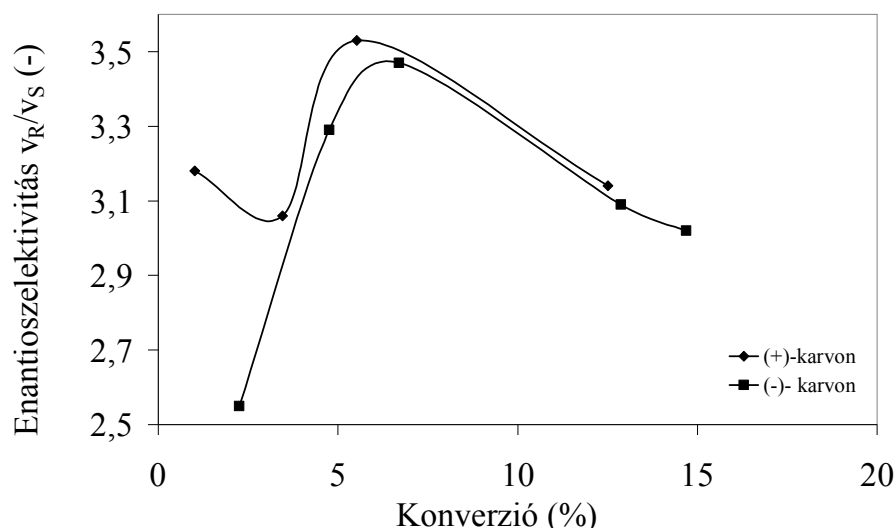


3.10. ábra: Az észter konverzió változása az idő függvényében (-)-karvon oldószerben különböző kiindulási vízkoncentrációk esetén.



3.11. ábra: Az észter konverzió változása az idő függvényében (+)- és (-)-karvon oldószerben 0.92% kiindulási vízkoncentráció esetén.

Az enantioszelektivitás vizsgálatakor (3.12. ábra) viszont azt állapítottam meg, hogy gyakorlatilag nincs eltérés a két karvon izomérben mért érték között. (A reakció kezdetén tapasztalt egyetlen kiugró érték vélhetően mérési hiba eredménye.)



3.12. ábra: Az enantioszelektivitás változása a konverzió függvényében (+)- és (-)-karvon oldószerben 0.92% kiindulási vízkoncentráció esetén.

A 3.5. táblázatban összefoglaltam a kinetikai állandókat. Látható, hogy a (-)-karvonban meghatározott v_{\max} értékek 10-15%-al magasabbak, mint (+)-karvon esetében. A K_M értékek eltérése alapján is (-)-karvon oldószerben megy gyorsabban végbe a reakció.

3.5. táblázat: A reakció kinetikai állandói különböző oldószerekben.

OLDÓSZER	$v_{\max} \times 10^6$ mol/h		$K_M \times 10^2$ mol/dm ³	
	(R)	(S)	(R)	(S)
(-)-karvon	7.3	3.6	1.5	2.0
(+)-karvon	6.5	2.8	1.7	2.9

3.1.6. Az oldószerek és az enzim hidratáltságának szerepe a *Candida rugosa* lipáz enzim stabilitásában [9, 15]

Különböző lipáz enzimek stabilitásának vizsgálatából ismert, hogy az immobilizálás, az enzimek kémiai módosítása és az oldószerek jelentősen befolyásolhatják az enzimek stabilitását. Ennek oka az enzimek felületének megváltozott hidrofíli/hidrofób jellege. A szakirodalom vagy vizes közegben vizsgálja az enzimek stabilitását [Gentili, 1997; Illeová, 2003; Matsumoto, 2002; Longo, 1997], vagy az enzimet pufferoldatban oldva adják a szerves oldószerbe az inkubálás megkezdésekor [Lozano, 2001; Lozano, 2003; Arroyo, 1999]. Ez utóbbi esetben az inkubálási szakaszban nem szabályozzák a vízaktivitást, csupán az enzim maradék

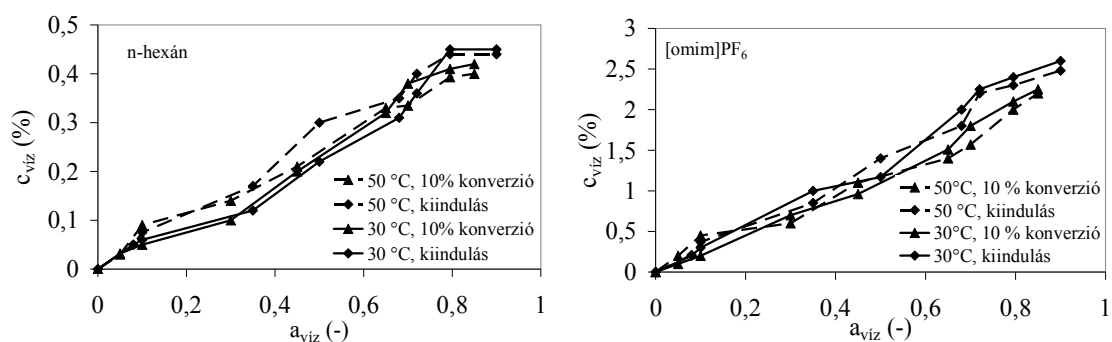
aktivitásának mérése során alkalmaznak vízaktivitás kontrollt. Az is előfordul, hogy immobilizált enzimet (nem enzimoldatot) inkubálnak ismeretlen vízaktivitású körülmények között ionos folyadékokban, és csak később, a maradék enzimaktivitás meghatározása során alkalmaznak vízaktivitás kontrollt [Persson, 2003], vagy az enzim aktivitását a kereskedelembe kapható lipáz aktivitás mérő kit segítségével mérik [Kaar, 2003]. Arra is található példa, amikor sem az inkubálás során, sem a maradék aktivitás mérése során nem állítják be a vízaktivitást [[Arroyo, 1999]. Mivel a lipáz enzimek konformációja, ezen keresztül pedig aktivitásuk jelentősen függ az enzim hidratáltsági állapotától, fontos, hogy mind az enzimek inkubálását, mind pedig a maradék aktivitásuk mérését szabályozott vízaktivitású oldószerekben végezzük. Ennek hiánya miatt a szakirodalomban azonos enzimekkel kapott felezési idők csak korlátozottan hasonlíthatók össze a különböző kutatócsoportok által végzett kísérletekben. A *Candida rugosa* lipáz enzim stabilitásának vizsgálata során célul tűztam ki, az enzim deaktivációs kinetikájának tanulmányozását és a felezési idő meghatározását 30 és 50 °C-on különböző szerves oldószerekben és ionos folyadékokban a vízaktivitás függvényében. Összefüggést próbáltam keresni az ionos folyadékok fizikai-kémiai tulajdonságai és a *Candida rugosa* lipáz enzim stabilitása között. Ehhez, mind az inkubálási szakaszban, mind pedig az aktivitás meghatározása során azonos vízaktivitást biztosítottam.

A vízaktivitás beállításához olyan módszerre volt szükség, amely 30 és 50 °C-on egyaránt alkalmazható. A sóhidrátpárok az ionos folyadékokkal sőt képezhetnek [Eckstein, 2002], valamint számos só magasabb hidrátformája nem stabil magasabb hőmérsékleteken, ezért nem alkalmas vízaktivitás beállításra [Halling, 1992]. Ezzel szemben a telített sóoldatok egyik előnye pont az, hogy széles hőmérsékleti tartományban jól definiált vízaktivitással rendelkeznek [Greenspan, 1977], ezért a telített sóoldatokkal történő vízaktivitás beállítást választottam a stabilitásvizsgálatokhoz.

30 és 50 °C-on a 0.11 - 0.80 vízaktivitás tartományon belül 7, ill. 6 különböző vízaktivitáson vizsgáltam a *Candida rugosa* lipáz aktivitását, melyet a 30 perc alatt keletkezett (*R*)-, és (*S*)-2-klór-propionsav-butil észterek mennyiségével jellemeztem. A kezdeti vízaktivitás beállítás hátránya, hogy az észterezés során keletkező víz megnövelheti a reakcióelegy vízaktivitását, így változhat az enzim hidratáltsága, és ezáltal az aktivitása is. Ha azonban az (*R,S*)-2-klór-propionsavat (limitáló szubsztrátum)

kis koncentrációban alkalmazzuk, a reakció elején a reakcióelegy polaritását főként az oldószer polaritása határozza meg. Ezért az várható, hogy a reakció elején képződő víz, melynek mennyiségét a sav koncentrációja határozza meg, nincs jelentős hatással a reakcióelegy vízaktivitására. Poláris oldószer esetén ez még inkább így van, hiszen a nagy tömegű poláris oldószerben, a keletkező kis mennyiségű víz várhatóan a n-hexánnál is kisebb mértékben módosítja a vízaktivitást. A feltételezés igazolására 30 és 50 °C-on is megvizsgáltam azt, hogy milyen mértékben tolja el a 10% konverzióig képződő víz a n-hexánnal és az [omim]PF₆ ionos folyadékkal összeállított reakcióelegy vízaktivitását.

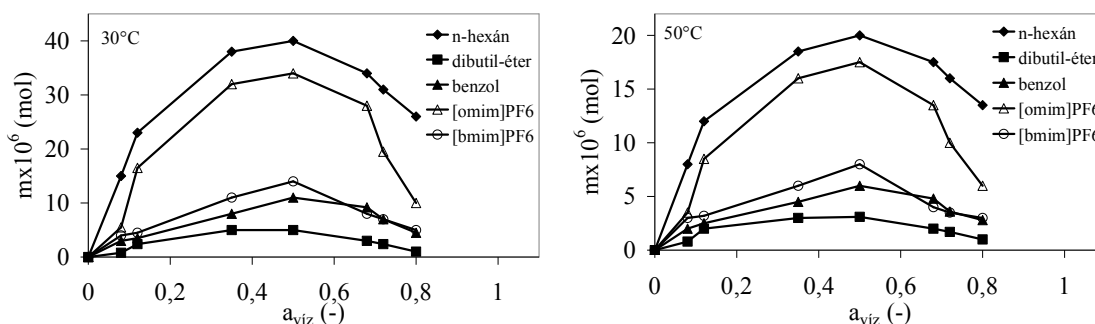
Amint az a 3.13. ábrán látható, azonos vízaktivitás eléréséhez [omim]PF₆ oldószerben kb. egy nagyságrenddel nagyobb vízkoncentráció szükséges, mint n-hexánban. A két oldószerben felvett vízadszorpciós izotermák lefutása hasonló. Ha az (R,S)-2-klór-propionsav szubsztrátum kiindulási koncentrációja 0.2 mol/dm³, a kezdeti vízkoncentráció pedig 0.15 mol/dm³ (0.2 m/m %), amikor a sav 10%-a átalakul, a reakcióelegy vízkoncentrációja 0.02 mol/dm³-rel nő meg. A vízadszorpciós izotermák alapján a reakcióelegy vízaktivitása ekkor n-hexán oldószer esetén 0.05-dal, míg [omim]PF₆ oldószer esetén 0.01-dal nő meg. Kijelenthető tehát, hogy az alacsony szubsztrátkoncentráció miatt 30 és 50 °C-on is elhanyagolható a reakcióelegy vízaktivitásának növekedése 10%-os konverzióig.



3.13. ábra: A kiindulási és a 10% konverzióknak megfelelő összetételű reakcióelegyek vízadszorpciós izotermái 30 és 50 °C-on n-hexán és [omim]PF₆ oldószerek esetén.

Ezt követően öt oldószerben, n-hexánban, dibutil-éterben, benzolban, ill. [bmim]PF₆ és [omim]PF₆ ionos folyadékokban vizsgáltam az enzim aktivitását és enantioszelektivitását az (R,S)-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciójában a vízaktivitás függvényében 30 és 50 °C-on. Az enzim aktivitását a 30 perc alatt keletkezett (R)-, és (S)-2-klór-propionsav-butil-észterek mennyiségével jellemeztem. Az

enzim aktivitása a vízáktivitás függvényében optimumgörbe szerint változott mindkét hőmérsékleten (3.14. ábra). 30 °C-on az összes oldószerben 0.51-es vízáktivásnál volt maximális a reakció sebessége (30 perc alatt keletkezett észterek mennyisége). A korábban tapasztaltakhoz hasonlóan n-hexánban és [bmim]PF₆ ionos folyadékban volt a legnagyobb az enzim aktivitása, míg dibutil-éterben, benzolban és [omim]PF₆-ban mintegy 75%-kal csökkent. 50 °C-on az enzim aktivitása jelentősen lecsökkent, és alacsonyabb vízáktivásnál ($a_w=0.29$) volt maximális a reakciósebesség minden oldószerben. [omim]PF₆-ban és benzolban a reakció sebessége 50 °C-on közel azonos maradt a 30 °C-on tapasztalttal. A hőmérséklet emelés hatására a reakciósebesség dibutil-éterben mintegy a felére, n-hexánban az 1/10-ére, míg [bmim]PF₆-ban az 1/4-ére csökkent. Jellemző, hogy 50 °C-on már kevésbé függ az enzim aktivitása a vízáktivástól, amit az észter mennyisége (mol) vs. a_w függvények kisebb meredeksége mutat. Ennek oka valószínűleg az, hogy magasabb hőmérsékleten a megnövekedett molekulamozgások határozzák meg döntően az enzim működését, és ez a vízáktivással már nem befolyásolható jelentősen.

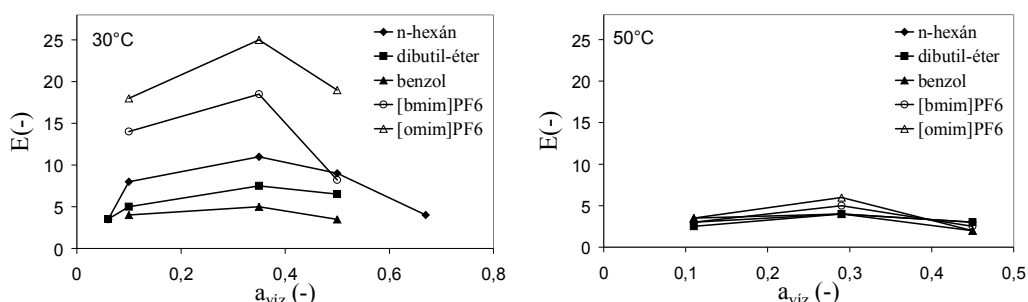


3.14. ábra: A tesztreakcióban keletkező (R)- és (S)-2-klór-propionsav-butil-észterek termékek mennyisége (m) a vízáktivitás függvényében 30 és 50 °C-on.

Reakcióidő: 0.5 h

Az enantioszelektivitás jellemzésére szolgáló enantiomer arány meghatározásához az eddigiekben Chen és munkatársainak a reverzibilis reakciókra kidolgozott módszerét alkalmaztam [Chen, 1986]. Ehhez a reakciók egyensúlyi állandójának ismerete is szükséges a vizsgált vízáktivásoknál 30 és 50 °C-on. Ennek meghatározása ebben az esetben igen hosszadalmas volna, főként az ionos folyadékokban. Mivel a fő célkitűzés a *Candida rugosa* lipáz enzim stabilitásának vizsgálata volt, egyszerűsítettem az enantioszelektivitás leírását. Az irodalmi áttekintésben az enantioszelektivitás

jellemzésére alkalmazható módszerek közül itt a kezdeti reakciósebességi állandók hányadosának meghatározását alkalmaztam.



3.15. ábra. Az enantioszelektivitás változása 30 és 50 °C-on a vízaktivitás függvényében.

Az enantioszelektivitás a reakció sebességéhez hasonlóan optimumgörbe szerint változik a vízaktivitással. A legmagasabb enantiomer arány [omim]PF₆ (E=25) és [bmim]PF₆ (E=18) ionos folyadékokban volt mérhető (3.15. ábra). A szerves oldószerek közül n-hexánban volt legmagasabb az enantiomer arány (E=11). Az enantioszelektivitás szempontjából optimális vízaktivitás 30 °C-on 0.29, ami alacsonyabb, mint az enzim aktivitása szempontjából optimális vízaktivitás (3.6. táblázat). A várakozásoknak megfelelően 50 °C-on az összes oldószerben jelentősen lecsökkent az enantiomer arány, ami azt jelzi, hogy az enzim nem volt képes ellenállni a magasabb hőmérsékleten megnövekedett molekulamozgásoknak. Az összes oldószerben 0.29-es vízaktivitásnál volt tapasztalható a legnagyobb enantiomer arány [38].

A *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitásának és enantioszelektivitásának változását a vízaktivitással Ma és munkatársai is vizsgálták [Ma, 2002]. Az enzim aktivitása számára optimális hidratáltságot az $a_w=0.53$, az enantioszelektivitás szempontjából pedig $a_w=0.33$ -as vízaktivitásnál tapasztaltak. Ez összhangban áll a 3.6. táblázatban bemutatott eredményekkel.

3.6. táblázat: Az enzimaktivitás és az enantioszelektivitás szempontjából optimális vízaktivitások 30 és 50 °C-on.

PARAMÉTER	$a_{\text{víz opt.}}$	
Hőmérséklet	30°C	50°C
Enzimaktivitás	0,51	0,29
Enantioszelektivitás	0,36	0,29

3.1.7. Folyamatos víztávoltítás heteroazeotróp desztillációval [1, 27, 28, 40]

Az előző fejezetekben láttuk, hogy a vízaktivitás állandó értéken tartása helyett megfelelő módszer az enzim aktivitásának és enantioszelektivitásnak megőrzésére az állandó víztartalom beállítása. Ehhez egy, az észterezések során ismert megoldást, a heteroazeotróp desztillációt alkalmaztam, amit gyakran alkalmaznak a reakcióban képződő víz eltávolításra. Régóta ismert megoldás az etanol benzollal történő víztelenítése. Enzimkatalitikus reakció esetében az oldószert úgy kell megválasztani, hogy az ne inaktiválja az enzimet (megfelelő legyen log P értéke), illetve abban az esetben, ha a termék emberi fogyasztásra kerül, megfeleljen a [Magyar Élelmiszerkönyv] előírásainak. Magát a heteroazeotróp desztillációs berendezést a 3.2.1.2. fejezetben ismertetem részletesen, ugyanis az itt alkalmazott laboratóriumi méretű berendezés szolgáltatta az adatokat és tapasztalatokat a későbbi, nagylaboratóriumi méretű berendezés kialakításához.

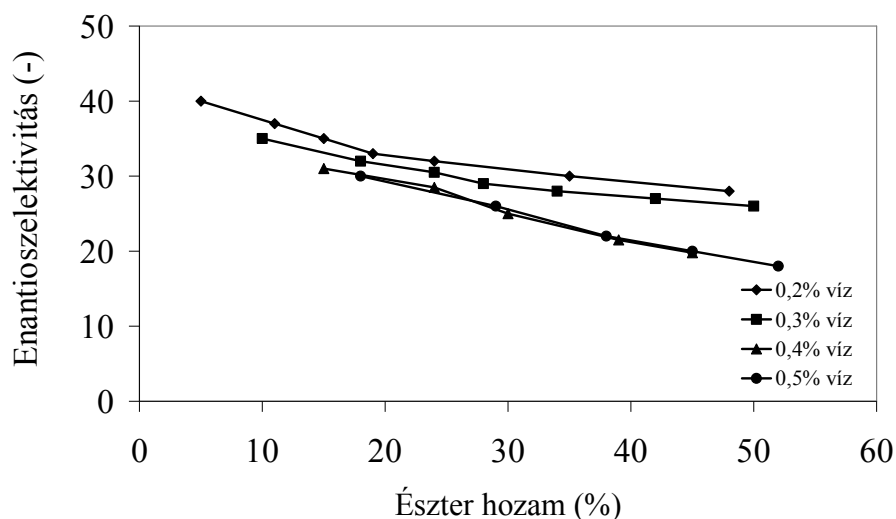
Vizsgálataimat a korábban közölt paraméterek mellett végeztem, a különbség csupán az volt, hogy a 2-klór-propionsav kiindulási anyag helyett 2-bróm-propionsavval dolgoztam. A változtatást az indokolta, hogy ebben az esetben nagyobbak az enantioszelektivitásban bekövetkező változások, ezzel a módszer hatékonysága látványosabban igazolható. Az enantioszelektivitás jellemzésére a korábban is ismertetett gyorsabb módszert, az (*R*)- illetve az (*S*)-észter kezdeti reakciósebességi állandójának hányadosát alkalmaztam. Az enzim aktivitását továbbra is a keletkező teljes észter mennyiséggel jellemeztem.

Oldószerként a 36.1 °C forráspontú n-pentánt használtam, ami a vízzel 34.6 °C-on forró azeotrópot képez. Ez a hőmérséklet a felhasznált *Candida rugosa* enzim optimális működési tartományába (25 – 40 °C) esik. A kiindulási reakcióelegy víztartalmát a víztelenítéssel elérhető legkisebb érték (0.025%) és 0.6% között változtattam (3.7. táblázat). Ugyanebben a táblázatban foglaltam össze a heteroazeotróp desztillációval állandó értéken tartott víztartalom mellett végzett kísérletek eredményeit is. Látható, hogy víztávoltítás nélkül, amikor a reakcióban képződő víz növelte a reakcióelegy víztartalmát, a 3 h reakcióidő után mért észter hozam 0.2 – 0.3% közötti kiindulási víztartalomnál mutatott maximális értéket, ezt követően fokozatosan csökkent. Ugyanezeket a vizsgálatokat állandó víztartalom mellett elvégezve a maximális észter hozamot 0.5%-nál kaptam.

3.7. táblázat: Az észterhozam függése a víztartalomtól.

KEZDETI VÍZTARTALOM, %	ÉSZTER- HOZAM, %	ÁLLANDÓ VÍZTARTALOM, %	ÉSZTER- HOZAM, %
0,025	2,8	-	-
0,1	8,1	0,1	6,2
0,2	28,4	0,2	11,8
0,3	26,5	0,3	19,4
0,4	20,1	0,4	30,6
0,5	17,1	0,5	36,5
0,6	12,8	0,6	26,6

Az enantioszelektivitást (v_R/v_S) vizsgálva azt tapasztaltam, hogy változó víztartalom mellett a 0.2% kiindulási víztartalomnál mért enantioszelektivitás értékek kissé magasabbak, mint a nagyobb víztartalomnál mért értékek. Az állandó víztartalom mellett a kép sokkal egyértelműbb: az enantioszelektivitás a víztartalom növekedésével egyértelműen csökkent (3.16. ábra). A növekvő víztartalom hatására fellépő enantioszelektivitás csökkenés, amit más reakcióban Kitaguchi és munkatársai korábban tapasztaltak [Kitaguchi, 1990)], az enzim szerkezetében bekövetkező változásokra vezethető vissza. A víztartalom csökkenésével az enzim szerkezete egyre merevebbé válik, és a merev enzim egyre jobban különbséget tud tenni az enantiomerek között.



3.16. ábra: Az enantioszelektivitás függése az észter hozamtól különböző víztartalmak mellett.

A heteroazeotróp desztilláció tehát alkalmas módszernek bizonyult a reakcióban keletkező víz eltávolítására és így a reakcióelegy víztartalmának állandó értéken tartására. Megoldandó feladat viszont a reakcióelegy hőmérsékletének szabályozása, hiszen a reakcióelegy hőmérsékletét egyértelműen az azeotróp elegy forráspontja határozza meg. A legközelebbi normál paraffin homológ, a n-hexán forráspontja 69 °C, a képződő n-hexán - víz azeotrópé pedig 61.6 °C. Ezek az értékek már kívül esnek *Candida rugosa* lipáz optimális hőmérsékleti tartományán, így a hőmérséklet hatásának mélyebb vizsgálatára ez esetben nem volt lehetőség.

3.1.8. Az oldószer hatása az enzim stabilitására [2, 44]

Annak érdekében, hogy tisztán az oldószer szerepét lehessen vizsgálni, az oldószerben való inkubálást és az enzim maradék aktivitásának mérését is 0.51-es vízakaktivitás mellett végeztem az összes oldószerben 30 és 50 °C-on is. Ehhez 30 °C-on $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ oldatot, 50 °C-on pedig NaBr telített sóoldatot használtam, amit az indokol, hogy a telített sóoldatok vízakaktivitása a hőmérséklet emelésével csökken, tehát ugyanazon só vízakaktivitása 30 és 50 °C-on eltérő.

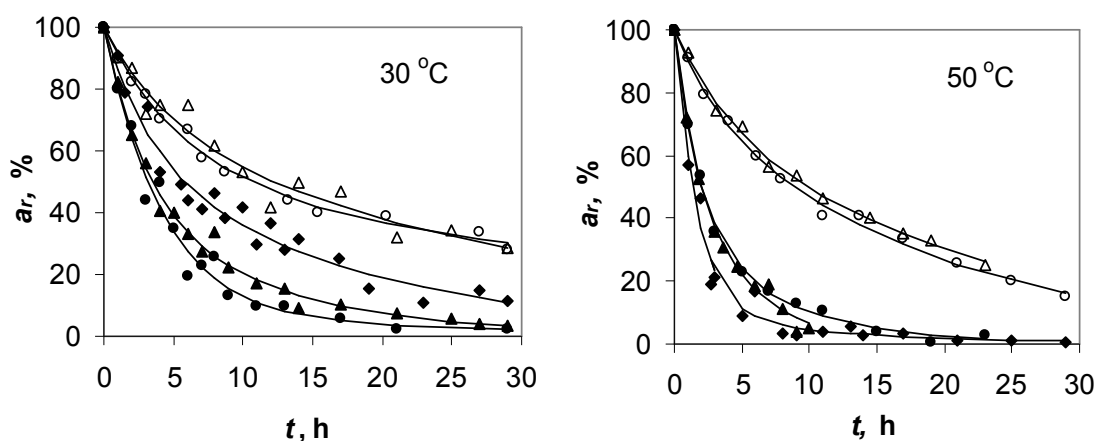
Az oldószerben való inkubálás megkezdése előtt az enzimet és az oldószerket külön-külön azonos vízakaktivásra állítottam be, majd az inkubálást követően az enzim maradék aktivitását az (R,S)-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciójában határoztam meg. Az enzim maradék aktivitását az oldószerben való inkubálás nélküli enzim aktivitásának százalékában fejeztem ki. Az enzim aktivitásának mérésére szolgáló tesztreakcióban a vízakaktivitás változik a konverzióval, azonban a korábbi megállapítások alapján az aktivitás jellemzéséhez csak a 10 % konverzióig keletkezett (R)- és (S)-2-klór-propionsav butil észter termékek mennyiségét vettem figyelembe.

3.1.8.1. Dezaktiváció leírása [17, 20, 56, 62, 63]

Az enzim maradék aktivitását az oldószerben való inkubálási idő függvényében ábrázoltam, majd az enzim maradék aktivitása-inkubálási idő kísérleti adatpontokra a Henley és Sadana által kidolgozott soros dezaktivációs kinetikai modellt illesztettem [Henley, 1984; Henley, 1985]. Az illesztés során az E-1.8. egyenletben szereplő α , k_1 és k_2 illesztési paramétereket határoztam meg.

A modell által generált görbék jó korrelációt mutattak a kísérleti adatpontokkal, tehát soros dezaktivációs modellel leírható a *Candida rugosa* lipáz enzim dezaktivációja (3.17. ábra). Az enzim aktivitása az oldószerben való inkubálási idő növelésével 30 és

50 °C-on is folyamatosan csökkent, ezért az enzim maradék aktivitása (a_r) és az eredeti enzim aktivitásának (a_0) hányadosát kifejező α paraméter kisebb, mint 1. (3.8. táblázat). Összehasonlítva a k_1 és k_2 dezaktivációs sebességi konstansokat, látható, hogy az enzim aktivitásának csökkenése kb. egy nagyságrenddel nagyobb sebességű az első lépésben (k_1), mint a másodikban (k_2).



3.17. ábra: A *Candida rugosa* lipáz enzim aktivitása (a_r) az inkubálási idő (t) függvényében 30 és 50 °C-on 0.51-es vízáktivitásnál.

◆-n-hexán, ▲-dibutil-éter, ●-benzol, △-[bmim]PF₆, ○-[omim]PF₆. Az egyedi pontok a kísérleti adatokat, a folytonos görbék a modell által generált adatpontokat jelölik.

3.8. táblázat: A *Candida rugosa* lipáz dezaktivációját leíró soros dezaktivációs modellel becsült paraméterek értéke.

OLDÓSZER	30 °C			50 °C		
	α_1	k_1	k_2	α_1	k_1	k_2
n-Hexán	0.48	0.25	0.06	0.08	0.57	0.07
Dibutil-éter	0.35	0.35	0.09	0.41	0.54	0.26
Benzol	0.05	0.24	0.04	0.28	0.52	0.13
[bmim]PF ₆	0.60	0.22	0.03	0.70	0.46	0.05
[omim]PF ₆	0.45	0.17	0.02	0.84	0.76	0.05

Az enzim ionos folyadékokban mutatott legnagyobb stabilitást. [Bmim]PF₆ és [omim]PF₆ ionos folyadékokban csak 12.3 és 10.6 h, míg a szerves oldószerekben 3.1-6.5 h elteltével csökkent eredeti aktivitása a felére 30 °C-on (3.9. táblázat). A szerves oldószerek közül n-hexánban volt tapasztalható a legnagyobb stabilitás.

3.9. táblázat: A *Candida rugosa* lipáz enzim felezési idejének és a felezési idő csökkenésének változása az oldószerek log P értékének függvényében 30 és 50 °C-on.

OLDÓSZER	Log P	t _{1/2} , h		Δt _{1/2} , %
		30 °C	50 °C	
n-Hexán	3.5	6.5	1.5	76.9
Dibutil-éter	2.9	3.5	2.1	40.0
Benzol	2.0	3.1	2.0	35.3
[bmim]PF ₆	-2.38 ± 0.25	12.3	10.2	17.0
[omim]PF ₆	-2.19 ± 0.24	10.6	9.0	15.1

A dezaktiváció sebessége 50 °C-on az összes szerves oldószerben jelentősen megnövekedett. Ennek oka az, hogy az enzim 50 °C-on, az első lépésben gyorsabban elveszíti aktivitását, mint 30 °C-on ($k_1(50^\circ\text{C}) \gg k_1(30^\circ\text{C})$). A második lépésben viszont az enzimaktivitás csökkenése, ami k_2 -vel jellemezhető, a legtöbb oldószerben hasonló mindkét hőmérsékleten. n-Hexánban pl. a felezési idő 6.5 h-ról 1.5 h-ra esett, amely mintegy 77 %-os csökkenést jelent. Ionos folyadékokban ezzel szemben csak kis mértékben változott az enzim stabilitása a hőmérséklet emelésére. A legnagyobb felezési idő (10.2 h) [bmim]PF₆ oldószerben volt mérhető 50 °C-on.

Annak jellemzésére, hogy az enzim stabilitása milyen mértékben csökkent a hőmérséklet emelés hatására (termikus stabilitás), kiszámoltam, hogy hány százalékkal alacsonyabb a felezési idő 50 °C-on a 30 °C-on kapott értékhez képest ($\Delta t_{1/2}$). A felezési idő hőmérsékletemelés hatására bekövetkező csökkenése az oldószerek hidrofóbicitásával egyenes arányosságot mutatott (3.9. táblázat). Míg az apoláris n-hexánban 50 °C-on mintegy 77 %-os a stabilitáscsökkenés, addig a két nagyságrenddel nagyobb polaritású [bmim]PF₆ és [omim]PF₆ ionos folyadékokban mindössze 17, illetve 15%.

3.1.8.2. A vízáktivitás hatása az enzim stabilitására [6, 12, 15, 43, 49]

A *Candida rugosa* lipáz enzim stabilitásának a vízáktivitással való változását n-hexánban és [omim]PF₆ ionos folyadékban tanulmányoztam. A szerves oldószerek közül n-hexánban érhető el a legnagyobb reakciósebesség és 30 °C-on ebben rendelkezik az enzim a legnagyobb stabilitással. Az előzőekhez hasonlóan az enzimet inkubáltam az oldószerben az adott vízáktiváción, majd a beállított vízáktivitású szubsztrátok hozzáadásával elindítottam a tesztreakciót.

A felezési idők azt mutatták, hogy az aktivitásához és szelektivitásához hasonlóan az enzim stabilitása is optimumgörbe szerint változik a vízaktivitás függvényében (3.10. táblázat). Az enzim stabilitásának az alacsonyabb vízaktivitás kedvez. n-Hexánban 0.36-os vízaktivitásnál az enzim felezési ideje 7.2 h, ami a vízaktivitás növelésével folyamatosan csökkent, és 0.80-as vízaktivitás esetén az enzim katalitikus aktivitása már 2.6 h-n belül a felére csökkent. [Omim]PF₆ ionos folyadékban hasonló tendencia figyelhető meg. Az enzim felezési ideje az optimális hidratáltságot biztosító 0.36-os vízaktivitás esetén 11.8 h, amely 0.80-as vízaktivitás esetén 6.3 h-ra csökken. 50 °C-on a legnagyobb felezési idő (3.8 h) 0.29-es vízaktivitásnál érhető el. Ennél magasabb vízaktivitás esetén n-hexánban az enzim gyorsan elveszítette katalitikus aktivitását, hiszen 0.67-0.80-as vízaktivitás esetén a felezés idő mindössze 1.2-1.5 h. [Omim]PF₆ ionos folyadékban a felezési idő 4.8 és 9.9 h között változott a vízaktivitással, ami azt mutatja, hogy az enzim stabilitása kisebb mértékben csökkent le [omim]PF₆ oldószerben nagyobb vízaktivitás esetén, mint n-hexánban.

Az enzimek ionos folyadékokban megnövekedett stabilitásának okai nem tisztázottak a szakirodalomban sem. Valószínűsítik, hogy azok az ionos folyadékok, amelyek kevesebb H-hídkötés kialakítására képesek anionjaik által, kevésbé zavarják az enzimmolekulán belüli H-hídkötéseket, ezáltal az enzimszerkezet stabil maradhat [Park, 2003].

3.10. táblázat: A *Candida rugosa* lipáz enzim felezési ideje n-hexánban és [omim]PF₆ ionos folyadékban 30 és 50 °C-on különböző vízaktivitások mellett.

30 °C			50 °C		
Vízaktivitás, -	t _{1/2} , h		Víz Aktivitás, -	t _{1/2} , h	
	n-hexán	[omim]PF ₆		n-hexán	[omim]PF ₆
0.11	5.8	10.3	0.11	3.4	8.5
0.36	7.2	11.8	0.29	3.8	9.9
0.51	6.5	10.6	0.45	2.1	9.4
0.67	5.4	8.9	0.64	1.3	7.3
0.73	3.3	8.4	0.69	1.5	6.6
0.80	2.6	6.3	0.79	1.2	4.8

3.1.8. A *Candida rugosa* lipáz enzim visszaforgathatósága ionos folyadékokban és szerves oldószerekben [9]

A katalizátorok élettartama és visszaforgathatóságuk az iparban igen jelentős szempont. Hagyományos szerves oldószerek esetén az enzim visszaforgatása úgy történhet, hogy az enzimet leszűrjük a reakcióelegyből, mossák, szárítják, és csak ezt

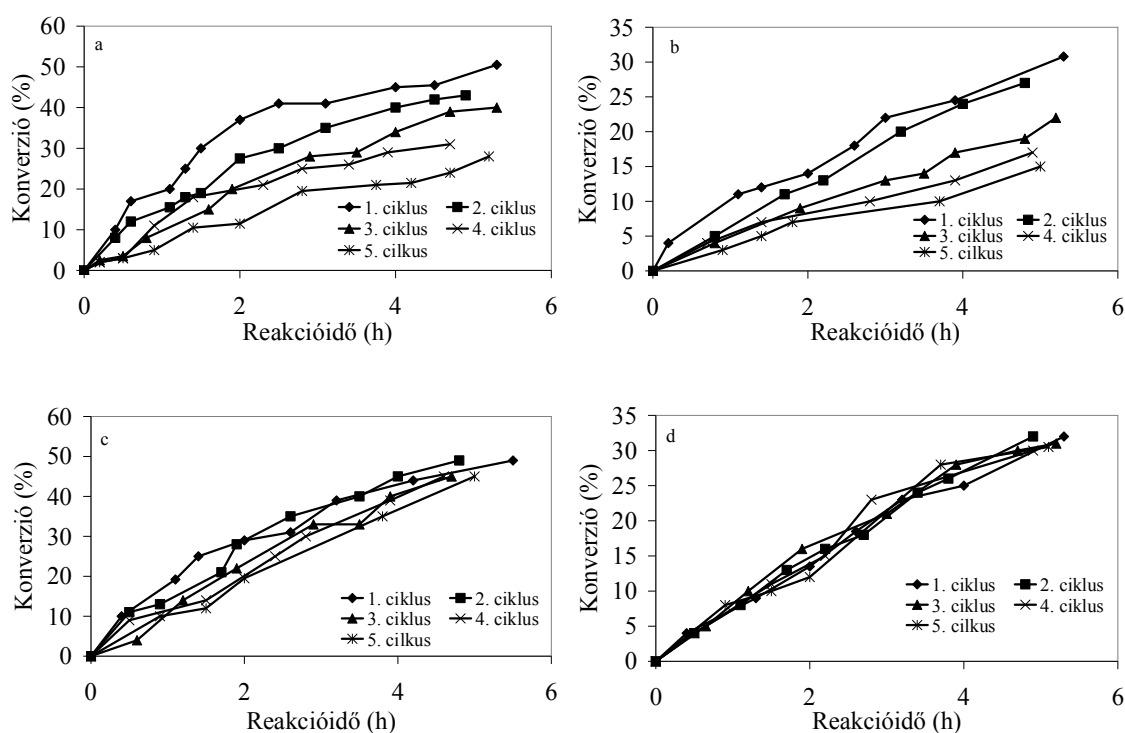
követően használható ismét egy következő reakcióban. Ionos folyadékokban az enzim visszaforgatásához nem az enzimet célszerű eltávolítani a reakcióelegyből, hanem a termékeket és a reagálatlan szubsztrátokat. Ez történhet pl. n-hexános extrakcióval, melynek végén az enzim, amely a szerves oldószerekben nem oldódik, az ionos folyadékban marad szuszpendálva. Ezt követően új szubsztrátok adhatók az ionos folyadékba, és így újabb reakció indítható. Az ionos folyadékokban egyszerűbb az enzimkatalizátor ismételt felhasználása és a termékek kinyerése is egyszerűsödhet a hagyományos szerves oldószerekhez képest.

Azon túlmenően, hogy ionos folyadékokban egyszerűbb az enzim ismételt felhasználása, az is fontos, hogy milyen mértékben csökken aktivitása és szelektivitása a többszöri felhasználás során. Ennek vizsgálatára, az *(R,S)*-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciójában alkalmazott enzimet még négyszer használtam a tesztreakció katalizátoraként. A visszaforgatott lipáz enzim aktivitását (relatív aktivitás) az első felhasználás során tapasztalt aktivitás százalékában fejeztem ki. A vízaktivitás állandó értéken tartására olyan módszert kellett választani, amely hosszabb időn keresztül képes konstans vízaktivitást biztosítani. A megfelelő módszer kiválasztásakor szempont volt, hogy a sók oldódhatnak ionos folyadékokban, a telített sóoldatokkal történő folyamatos vízaktivitás kontrollhoz pedig meglehetősen időigényes olyan összeállítás elkészítése, amely megfelelő víztranszportot tesz lehetővé. A laboratóriumban már rendelkeztem tapasztalattal pervaporációval történő víztávolítás terén, így az *(R,S)*-2-klór-propionsav és 1-butanol észterezési reakciója kapcsán is ezt a megoldást választottam az állandó víztartalom, ezen keresztül a közel azonos vízaktivitás beállítására.

A visszaforgathatóságot n-hexánban, toluolban, ill. [bmim]PF₆ és [omim]PF₆ ionos folyadékban vizsgáltam 30 °C-on. A reakciósebesség 0.51-es vízaktivitásnál volt a legnagyobb, ezért ennek a vízaktivitásnak a tartása volt a cél. A reakció kezdeti vízaktivitását Mg(NO₃)₂ telített oldatával 0.51-re állítottam be, majd a reakciót az enzim hozzáadásával indítottam. Adott időközönként mintát vettem a reakcióelegyből, és Karl-Fischer titrátorral megmértem annak víztartalmát. A 0-80 % konverciónak megfelelő összetételű reakcióelegyek vízadszorpciós izotermáiból (3.6. ábra) látszik, hogy ahhoz, hogy az apoláros n-hexánban a reakció során 0.51-es vízaktivitást tartsunk, a víztartalmat kismértékben csökkenteni kell a konverzió előrehaladtával. A képződő víz folyamatos eltávolítása tehát nem elegendő, hiszen kis mértékben csökkenő víztartalom esetén lesz állandó a vízaktivitás a reakcióelegyben. Az [bmim]PF₆ és [omim]PF₆ vízzel

nem elegyedő ionos folyadékok, amelyek jóval több vizet képesek oldani, mint a *n*-hexán. Az [omim]PF₆-tal összeállított reakcióelegy vízadszorpciós izotermáján is látszik, hogy 0.2 mol/l (*R,S*)-2-klór-propionsav koncentráció esetén képződő víz csak elhanyagolható mértékben tolja el a vízáktivítást. Ez azt jelenti, hogy ionos folyadékok esetén elegendő a képződő vizet eltávolítani, és nem szükséges csökkenő víztartalmat tartani a reakcióelegyben.

A kívánt víztartalom beállításához folyamatosan mértem a keletkezett (*R*)- és (*S*)-2-klór-propionsav-butil észter mennyiségét, valamint a reakcióelegy víztartalmát. Amennyiben a mért víztartalom magasabb volt a kívánatosnál, a reakcióelegy egy részét a pervaporációs membránra vezetem, majd pedig vissza a reakcióelegybe, mindaddig, amíg a reakcióelegy víztartalma be nem állt a kívánatos értékre. Először azt vizsgáltam, hogy a reakcióelegyből adott mennyiséget a pervaporációs modulon keresztülvezetve, mennyivel csökken annak víztartalma. Az egyes reakciók során keletkezett összes észter mennyiségét az időben a 3.18. ábra szemlélteti.



3.18. (a-d) ábra: A keletkezett (*R*)- és (*S*)-2-klór-propionsav butil észterek mennyisége az idő függvényében 30 °C-on.

a-*n*-hexán, b-toluol, c-[bmim]PF₆, d-[omim]PF₆.

Az enzim aktivitását az ismételt reakciók során a 3.11. táblázat szemlélteti.

3.11. táblázat: A *Candida rugosa* lipáz relatív aktivitása az ismételt reakciókban.
($t=5$ h, $a_w=0.51$)

OLDÓSZER	RELATÍV ENZIMAKTIVITÁS, %				
	1	2	3	4	5
n-hexán	100	85.9	79.5	61.3	55.1
tolul	100	85.2	72.1	55.7	50.4
[bmim]PF ₆	100	99.6	95.4	94.4	92.6
[omim]PF ₆	100	99.1	97.1	96.5	95.5

n-Hexánban és toluolban az első körben tapasztalt aktivitásnak 55.1 illetve 50.4%-ával rendelkezett az enzim az ötödik körben. Ezzel szemben [bmim]PF₆ és [omim]PF₆-ban az enzim megtartotta eredeti aktivitásának 92.6 illetve 95.5%-át. Ez ismét azt mutatja, hogy az ionos folyadékok stabilizálják a *Candida rugosa* lipáz enzimet. Az enzim aktivitásához hasonlóan, a *Candida rugosa* lipáz enantioszelektivitása is eltérő mértékben csökkent az egyes oldószerekben az ismételt felhasználások során (3.12. táblázat).

3.12. táblázat: A visszaforgatott *Candida rugosa* lipáz relatív enantioszelektivitása.
(30 °C, $a_w=0.51$.)

OLDÓSZER	RELATÍV ENANTIOSZELEKTIVITÁS, %				
	1	2	3	4	5
n-hexán	100	86	86	71	43
toluol	100	83	78	65	29
[bmim]PF ₆	100	100	100	94	94
[omim]PF ₆	100	100	90	85	85

A stabilizáló hatás oka a reakcióelegyben keresendő a szubsztrátok és a termékek között. Annak tisztázására, hogy az (*R,S*)-2-klór-propionsav, az 1-butanol, vagy esetleg az észter termék védi meg az enzimet az aktivitáscsökkenéstől, az enzim stabilitását ezek jelenlétében is meg kellene vizsgálni. Az enantiomerek eltérő módon illeszkednek az enzim aktív helyéhez, így elképzelhető, hogy az (*R*)-, és az (*S*)-2-klór-propionsav vagy észterek nem azonos mértékben stabilizálják az enzimet,

3.2. Aroma észterek előállítása enzimkatalitikus reakcióval

3.2.1. Etil-acetát előállítása

3.2.1.1. Az etil-acetát enzimkatalitikus észterezésének kinetikai vizsgálata szerves oldószerben és oldószermentes közegben

Az etil-acetát előállításának kinetikai vizsgálatát szerves oldószerben és oldószermentes közegben kolléganóm, Bélafiné dr. Bakó Katalin értekezésemmel egyidőben benyújtott „Membrán bioreaktorok” című MTA Doktori értekezése tárgyalja. Bár a hivatkozott publikációk egy részében társszerző vagyok [11,45], az ott közölt megállapítások Bélafiné dr. Bakó Katalin saját eredményei, azokat itt csak azért ismertetem, mert az szükséges munkám további részének megértéséhez.

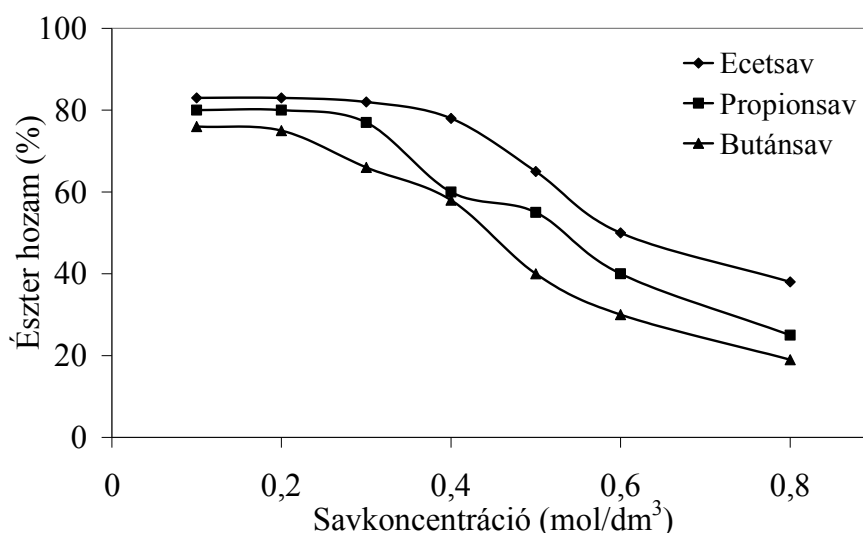
„Megállapítottuk, hogy az ecetsav és az etanol NOVOZYM 435 lipáz enzimmel katalizált észterezési reakciója során 60 °C-on n-heptánban erősebb az ecetsav okozta szubsztrát inhibíció, mint az etanolé, ezért a reakciót oldószermentes közegben etanol felesleg mellett valósítottuk meg, s meghatároztuk a biokonverzió kinetikai paramétereit ($K_M = 0.68 \text{ mol/l}$, $v_{max} = 0.12 \text{ mol/l}$, $K_{SI} = 1.73 \text{ mol/l}$). Integrált rendszert alakítottunk ki, ahol 0.018 m^2 felületű PERVAP 1060 pervaporációs membránnal nyertük ki az észtert, A4 típusú zeolittal töltött oszlopban pedig a képződő vizet, s 20%-al magasabb észter hozamot értünk el 2 óra reakcióidő után, mint a terméelvétel nélküli oldószermentes biokonverziónál.”

3.2.1.2. Nagylaboratóriumi eljárás kidolgozása etil-acetát előállítására [4, 29, 32, 33]

A kinetikai vizsgálatokat követően kezdtem hozzá egy olyan nagylaboratóriumi méretű berendezés kialakításához, ami adatokat szolgáltat az ipari méretű berendezés kialakításához. Célom a [Magyar Élelmiszerkönyv] előírásainak megfelelő természetes aroma észterek előállítása volt, tehát természetes eredetű kiindulási anyagokat, természetes ecetsavat és etanolt alkalmaztam. A víz aktivitásának/koncentrációjának jelentőségére a korábbi fejezetekben többször utaltam. A nagylaboratóriumi berendezés kialakításánál a víz koncentráció állandó értéken tartására csak olyan módszer jöhetett számításba, amivel folyamatosan és szabályozható módon távolítható el a reakcióban képződő nagy mennyiségű víz. Zeolittal történő adszorpció, pervaporáció és heteroazeotróp desztilláció jött számításba. Megfelelő méretű pervaporációs berendezés kialakítása a rendelkezésre álló anyagi források mellett megfizethetetlen lett volna, így a választás először az adszorpcióra, ennek nehézségeit megtapasztalva a heteroazeotróp desztillációra esett, amit már laboratóriumi méretben korábban sikeresen alkalmaztam.

A kinetikai mérések során n-heptánt alkalmaztam, korábbi észterezési munkáimban n-hexánt használtam oldószerként, a reakcióelegy optimális víztartalma 0.4% volt. A n-hexán-víz azeotróp forráspontja 61.6 °C volt, ami magasabb, mint az enzim optimális működési hőmérséklete. Kísérleteimhez ezért az egy szénatomszámmal kisebb homológot, a n-pentánt választottam. A n-pentán-víz azeotróp forráspontja 34.6 °C, vagyis 27 °C-kal alacsonyabb. Ez nyilvánvalóan kisebb reakciósebességet eredményez, ugyanakkor termikus dezaktiválódással kevésbé kellett számolni. Mindhárom említett oldószer log P értéke olyan magas tartományban van, ami az enzim számára biztosítja az optimális működési feltételeket, elsősorban hidratáltságot [35].

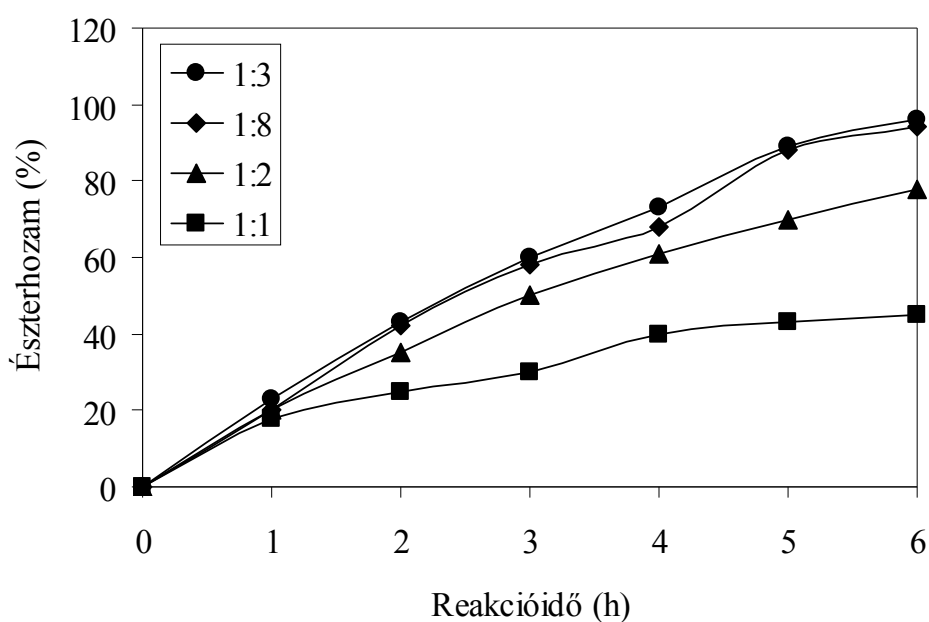
A sav gátló hatásának vizsgálata során kapott eredményeket a 3.19. ábra mutatja. Vajsavval, propionsavval és ecetsavval rázatott lombikban végzett méréseim során azonos sav:alkohol molarány mellett vizsgáltam az észterezési reakciót. A kiindulási savkoncentráció növelésével mindegyik esetben csökkent az elért észter hozam, a csökkenés az ecetsav esetében volt a legmarkánsabb [19]. Ennek ellenére – a Megbízó kívánságára - az etil-acetát előállítására dolgoztam ki nagylaboratórumi eljárást abból a megfontolásból, hogy az itt szerzett tapasztalatok könnyebben hasznosíthatók lesznek a nagyobb szénatomszámú, kisebb gátlást okozó savak esetében. A rázatott lombikos kísérletek eredményeiből az a következtetés volt levonható, hogy a sav koncentrációt a sav inhibíció miatt alacsony értéken célszerű tartani. Ezt a megállapításunkat a későbbiekben számos idéző cikk megerősítette.



3.19. ábra: Az észter hozam változása a savkoncentráció függvényében.

(sav:alkohol molarány 1:3; 0.01 mol sav, 0.03 mol etanol; reakcióidő: 6 óra; 0.1 g Novozyme 435™ enzim; kezdeti vízkoncentráció: 0.4%; reakcióhőmérséklet: 35 °C; rázatási intenzitás: 150 rpm)

A kinetikai vizsgálatok eredményeiből egyértelmű, hogy alkohol felesleg mellett célszerű dolgozni. Ennek mértéke azonban jelentősen befolyásolta a reakciót követő down stream műveleteket, így értékét külön vizsgálattal határoztam meg. A 3.20. ábrán bemutatom az etil-acetát hozam függését a sav:alkohol mólaránytól. Megállapítható, hogy a fenti mólarányt 1:1-től 1:8-ig növelve az 1:3-as aránynál kaptuk az optimális értéket. Ez az érték azért is kedvező, mert a feldolgozás során így kevés maradék etanolt kellett eltávolítani a reakcióelegyből [39].

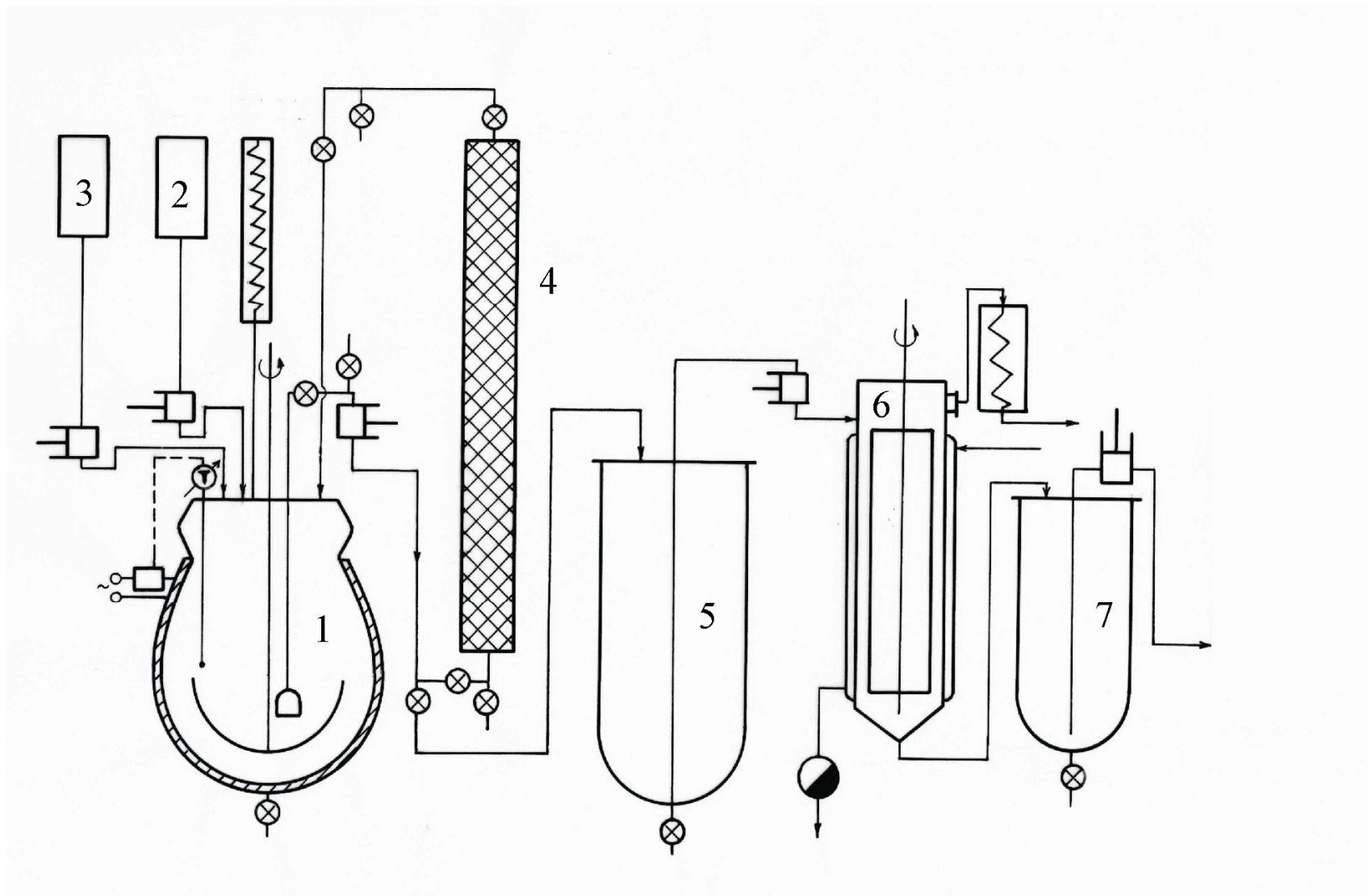


3.20. ábra: Az észter hozam változása a reakcióidő függvényében különböző ecetsav:etanol mólarányok esetén.

(0.01 mol ecetsav; 50 ml n-hexán; 0.1 g Novozyme 435™ enzim; kezdeti vízkoncentráció: 0.4%; reakcióhőmérséklet: 35 °C; rázatási intenzitás: 150 rpm)

A nagylaboratóriumi kísérleti berendezések tervezésekor és kialakításakor elsőrendű feladat volt, hogy csak olyan szerkezeti anyagokat alkalmazzak, amelyek a reakció komponenseivel érintkezve biztosan nem szennyezik a terméket. A céltermék, az etil-acetát e tekintetben komoly gondot okozott, mivel a legtöbb műanyagot megtámadja. A berendezés minden elemét ezért boroszilikát üvegből készítettem és csak ezek csatlakoztatásához használtam teflon csöveket.

A nagylaboratóriumi méretű berendezés kialakítása előtt kísérleteket végeztem egy laboratóriumi méretű berendezésekből kialakított készülékben (3.21. ábra), amit a következőkben vázlatosan ismertetek. Ennek központi része egy keverővel, külső elektromos fűtéssel és visszacspegő hűtővel ellátott 12 l névleges térfogatú üvegrektor



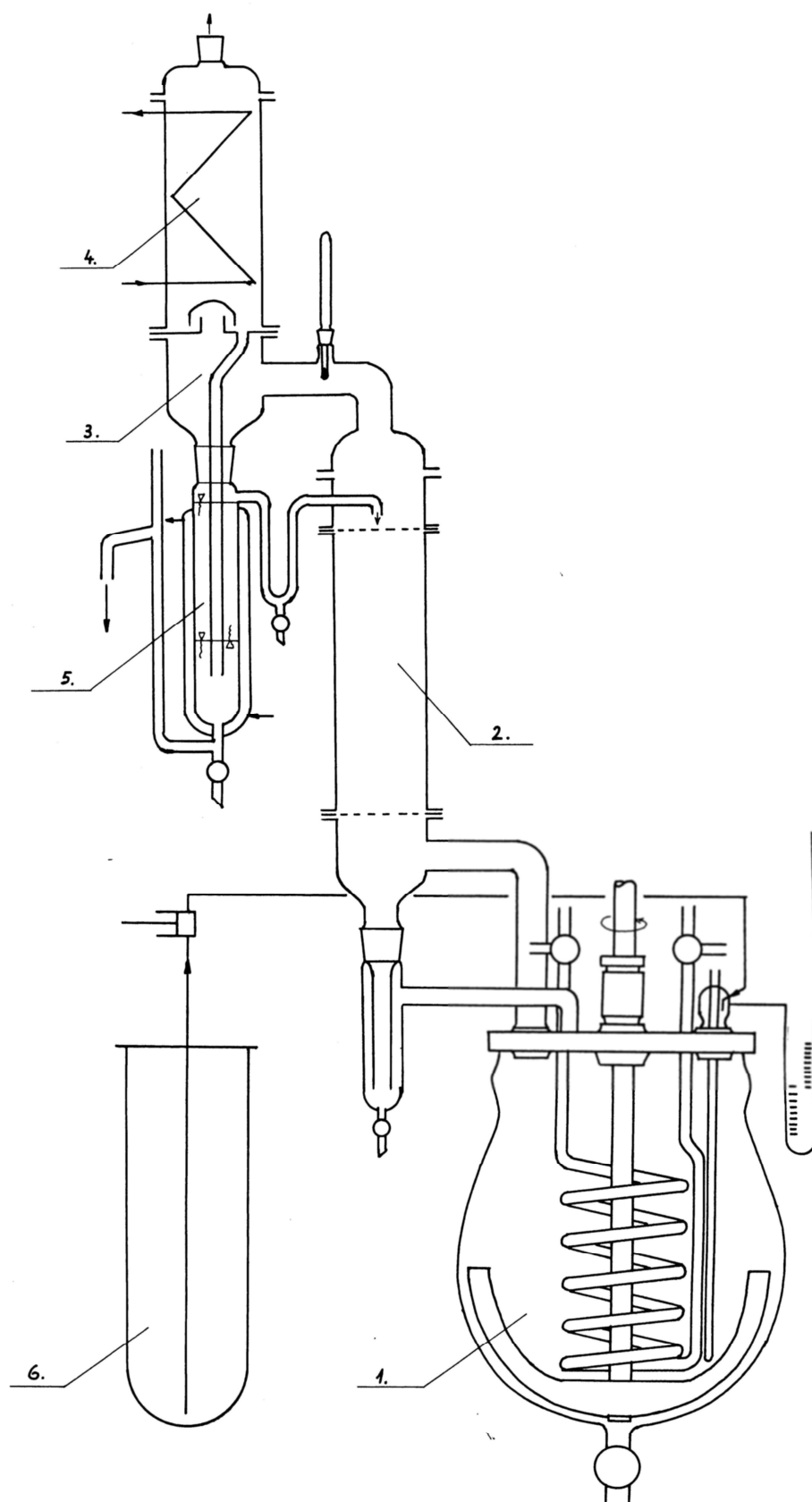
3.21. ábra: Az etil-acetát előállítására szolgáló laboratóriumi méretű berendezés vázlata.
Jelöléseket lásd a szövegben!

/1/. A reaktort félig töltöttem meg a reakcióeleggyel, hozzáadtam az enzimet, az ecetsavat /2/ és az etanolt /3/ fogyásuk ütemében a megfelelő tartályból pótoltam. A reakcióban keletkező víz eltávolítására egy 1.5 m hosszú, 0.07 m átmérőjű, 5 l hasznos térfogatú, 3A zeolittal töltött adszorber szolgált. A reakció lejátszódása után a reakcióelegyet az /5/ tartályba szivattyúztam, az oldószert (n-pentán) a /6/ filmbepárlóban ledesztilláltam, a nyers reakcióelegyet a /7/ tartályban gyűjtöttem, majd egy (az ábrán nem jelölt) frakcionáló berendezésben eltávolítottam az oldószer nyomokat és nyertem a tiszta etil-acetátot. A laboratóriumi berendezésben szerzett legfontosabb tapasztalat az volt, hogy a zeolitos adszorpcióval nehezen szabályozható az elvett víz mennyisége, ami az enzim aktivitását is befolyásolta.

A nagylaboratóriumi kísérleti berendezés (3.22. ábra) két jól elkülönülő részből, a reaktorból és a hozzá kapcsolódó víztelenítőből valamint a frakcionáló berendezésből állt. Az utóbbi egység felépítése a teljes kísérletsorozat alatt változatlan volt, a reaktort azonban, a reakcióelegy hatékony víztelenítése céljából, többször módosítani kellett. A reaktor és a hozzá kapcsolódó víztelenítő berendezés több funkciót is betöltött. Ebben végeztem magát az enzimkatalitikus reakciót, a termékelegy etanol és oldószer mentesítését valamint a kb. 94 %-os természetes etanol abszolútizálását. Mivel a reakció végén a maradék oldószer eltávolítását a reaktorban végre tudtam hajtani, nem volt szükség filmbepárló használatára. A frakcionáló berendezésben végeztem egyrészt a termékelegy finom frakcionálását, másrészt pedig a reakcióban képződő kb. 70 %-os alkohol töményítését kb. 94 %-ra.

A reakciókat egy 50 l-es névleges térfogatú, belső spirálfűtésű, IKA RW 25 típusú, 60 W teljesítményű, a 40-1400 min⁻¹ tartományban változtatható fordulatszámú keverőmotorral meghajtott, anker keverővel ellátott SIMAX üveg reaktorban /1/ végeztem (3.22. ábra). A reaktort hőmérővel, U-csöves manométerrel és olyan mintavevővel szereltem fel, ami biztosította a forrásban levő anyagból a mintavételt. A reaktor fűtése egy 100 l-es cirkulációs vizes termosztát illetve 3 bar nyomású gőz alkalmazásával történt. Háromállású csapok biztosították a fűtési módok közötti váltást és a csapvizes hűtésre való átállást.

A reaktorhoz 35 mm átmérőjű páracsővel csatlakozott egy 500 mm hosszúságú, 100 mm átmérőjű 6x6 mm-es Tex-Pack töltettel töltött /2/ kolonnatag. Ennek becsült elméleti tányérszáma 10. A kolonnáról ellenáramban visszafolyó reflux egy szifonon át jutott vissza a reaktorba. A kolonna felső része a fejreflux visszavezetésére szolgáló



3.22. ábra: Az etil-acetát előállítására szolgáló nagylaboratóriumi méretű berendezés vázlata.

Jelöléseket lásd a szövegben!

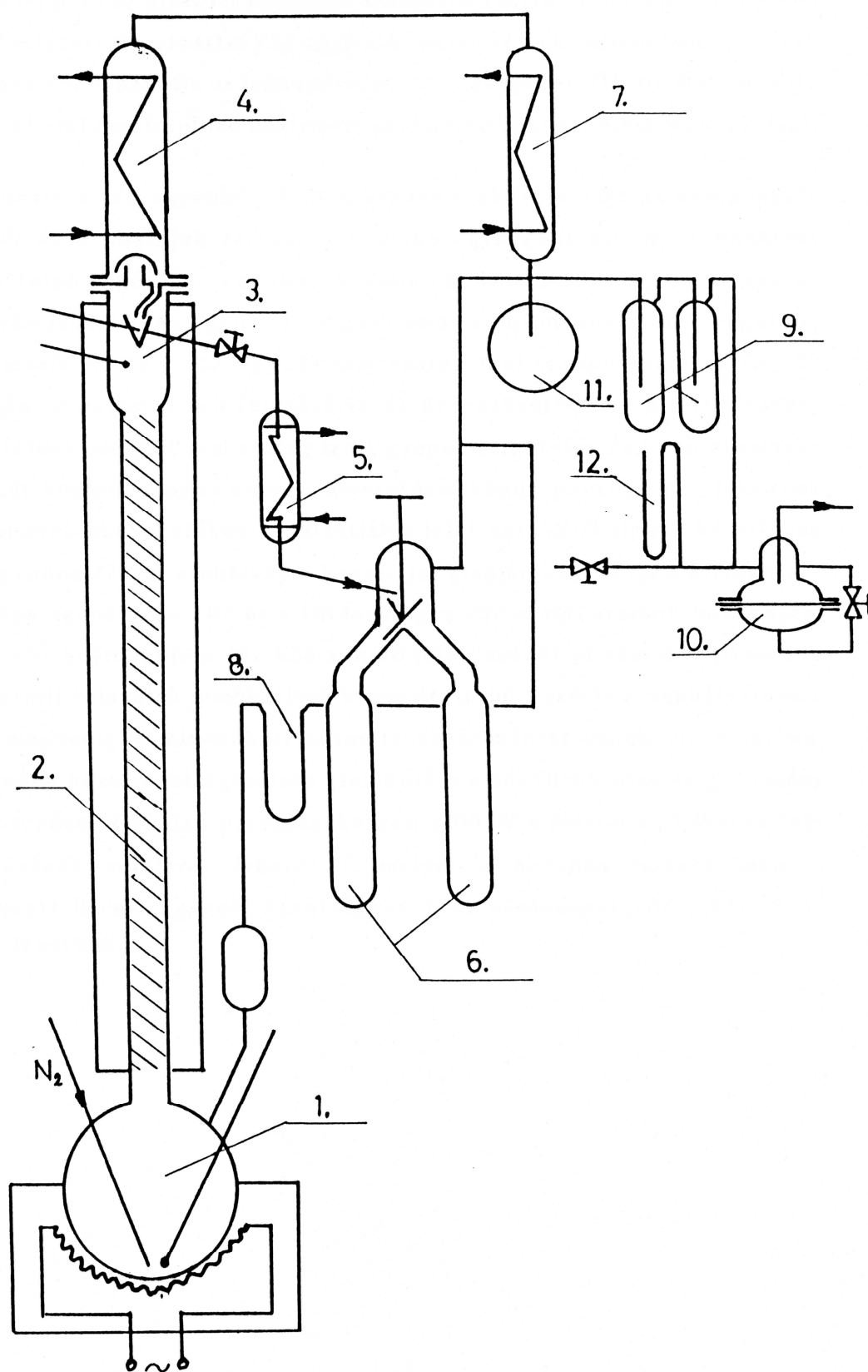
taggal egészült ki. A kolonnából távozó gőzök a /3/ azeotróp reflux fejbe jutottak. E fölött helyezkedett el egy /4/ vízhűtési kondenzátor, ami fölött (az ábrán nem jelölt) intenzív mélyhűtő található. A refluxfej harangtányéros megoldással úgy került kialakításra, hogy a fej felett elhelyezett /4/ intenzív kondenzátorban lecsapódó gőzök teljes egészében az azeotróp reflux fej alatt elhelyezett /5/ Florentini edényben levő folyadék alá jussanak. A vízhűtéssel ellátott Florentini edényből a heteroazeotróp elegy felső fázisa szétválás után a kolonna felső részére, az alsó fázis pedig egy gyűjtőtartályba folyt. Az ecetsav-etanol elegy beadagolására a /6/ 50 l-es adagoló tartályból egy Prominent gamma 4 típusú, 7,7 l/h maximális teljesítményű teflon membrános szivattyúval történt. Ugyancsak ez a szivattyú végezte a reakció végén az ecetsav valamint a reakcióelegy etanol mentesítésekor a víz beadagolását.

A kialakított frakcionáló berendezést atmoszférikus és vákuum üzemmódban egyaránt alkalmazható volt (3.22. ábra). A berendezés bojleréül egy négynyakú, 10 l-es gömblombik /1/ szolgált a hozzá tartozó fűtésszabályozóval ellátott kráterrezsóval együtt. A lombik középső Ns 70-es csiszolatához csatlakozott az adiabatikus kompenzációs fűtéssel ellátott 1,5 m hosszú, 65 mm belső átmérőjű, 5 l Pro-Pack töltettel töltött kolonna /2/. A bojler oldalsó három csiszolatához kapcsolódott a differenciál manométer /8/, a hőmérő és a nitrogén kapilláris. A kolonna felső részén szintén Ns 70-es csiszolattal csatlakozott a mágnes szeleppel ellátott, időkapcsolóval vezérelt reflux fej /3/. Ehhez laza peremkötéssel illeszkedett a vertikális elrendezésű belső spirálfűtésű intenzív refluxhűtő /4/.

A párlat a mágnes szelepen keresztül egy vízhűtési párlathűtőn át jutott a szedőrendszerbe /6/. Ez úgy volt kialakítva, hogy bármely üzemmód esetében üzem közbeni szedőváltást tett lehetővé, a három, egyenként 2 l-es szedőbe. A refluxhűtő /4/ egy utóhűtőhöz /7/, szedőlombikhoz /11/ és két kifagyasztóhoz /9/ csatlakozott, melyek után a membrános vákuumszabályozó /10/ és a vákuummérő /12/ következett.

A refluxfej /3/ működése a következő: Az intenzív hűtőben kondenzálódott párlat a tányérról a lefolyó vezetéken át az üvegszeleppel ellátott túlfolyós tölcserbe folyt. A szelepet a lágyvas maggal ellátott üvegtesttel együtt az üvegrugó ellenében az elektromágnes mozgatta az időkapcsoló megfelelően beállított ki- illetve bekapcsolási ideje szerint.

A kolonnatest két, egyenként 0,75 m hosszú szakaszra osztott kompenzáló fűtésből és a hozzájuk tartozó szabályozó egységből állt. A kolonnatest alsó s felső



3.23. ábra: A reakcióelegy feldolgozására szolgáló frakcionáló berendezés vázlata.
Jelöléseket lásd a szövegben!

végén két-két hőelem található: az egyik közvetlenül a kolonnacső falán rögzítve, míg a másik egy 20 mm vastag izolítgyapot szigetelés palástján. E palástra van felcsévélve az üvegszövetbe foglalt fűtőszalag. E fölött pedig 30 mm vastag izolítgyapot szigetelés van elhelyezve. E két hőelem azonos anyagú kivezetései közös pontban csatlakoznak, és kompenzációs vezetéken át juttatják a jelet egy AS 21 típusú kétállásos szabályozóhoz. A szabályozó a kapott jel alapján kapcsolja a kimenő teljesítményszabályozón át a fűtőszalagra a fűtőáramot mindaddig, míg az hőérzékelők jelerősségei ki nem egyenlítődnek. Ily módon a bojlerből felszálló gőzök által közvetített hő vezérli a szabályozórendszert, mégpedig a mindenkori aktuális gőzhőmérsékletnek megfelelően. Az aktuális hőmérsékletgradiens kialakulása a két fűtőszalag teljesítmény különbségével (az alsó oszlopszakaszon 1200 W a felsőn 800 W) és felcsévézésének módjával érhető el, melyet a kolonna hossza mentén elhelyezett három egyenlő távolságban lévő hőelemmel ellenőrizhetünk.

A kísérletek során a reaktorba 14 l n-pentánt, 3 l etanolt, 1 l ecetsavat és 1 kg Novozym 435 enzimet töltöttem. A reakcióelegyet fokozatosan melegítve, 32,5-35 °C fejhőmérséklet mellett a keletkező vizet heteroazeotróp desztillációval eltávolítottam. Az ecetsavat és az alkoholt elreagálásuk ütemében pótoltam, így biztosítva az alacsony sav koncentrációt és az állandó ecetsav:etanol mólarányt. A víz eltávolítását (a kb. 70 %-os etanol elvétele) úgy szabályoztam, hogy a reakcióelegy víztartalma 0,4-0,6% között legyen. A reakcióelegy végső térfogata 120 óra reakcióidő után 41 l volt, ez kb. 28 kg etil-acetátot tartalmazott. Az enzim eltávolítása után a reakcióelegyet folyamatos víz beadagolás mellett azeotróp desztillációval etanol mentesítettem, majd kidesztilláltam a n-pentán oldószert. Az így nyert kb. 95 % etil-acetátot tartalmazó anyagot frakcionált desztillációnak vetettem alá. A végtermék gázkromatográfiás tisztasága 99,9 % felett volt, víztartalma 0,01 %, savszáma pedig 0,12 mg/g volt. Így a termék minősége mindenben meghaladta a rendelkezésünkre bocsátott standard minta paramétereit.

Három reakcióban összesen 66,1 kg etil-acetátot állítottam elő, ez ecetsavra vonatkoztatva 86,8 % kitermelésnek felel meg. Az enzim a több mint 330 óra reakcióidő alatt nem veszített aktivitásából. Az alkalmazott reaktor kapacitása - ha csak az enzimkatalitikus reakciót végezzük a reaktorban – 1,5 t/év. Kísérleti eredményeink alapján a NITROIL Kft.-nél elkészült egy 20 t/év kapacitású természetes aroma gyártó üzem megvalósíthatósági tanulmánya, a technológiai kapcsolási terv és a szükséges

épületek kialakítása. A munka befejezését a NITROIL Kft. privatizációja akadályozta meg.

3.2.1.3. Folyamatos eljárás etil-acetát előállítására ionos folyadékban végzett enzimatisztalítással [26, 46-48, 58, 59, 61, 64]

Szakaszos kísérleteket végeztem az etil-acetát enzimatisztalítására ionos folyadék oldószerben a hozam szempontjából optimális paraméterek megállapítására CALB enzimet alkalmazva. Céлом az volt, hogy az előző pontban ismertetett alacsony forráspontú, gyúlékony oldószert környezetbarát anyaggal, zöld oldószerrel helyettesítsem. Eközben felhasználtam az irodalomban hasonló aroma észterek előállítása során rendelkezésre álló információkat. Oldószerként a [bmim]PF₆ ionos folyadékot választottam, amely az etanollal és az ecetsavval homogén reakcióelegyet képezett, és már számos enzimkatalitikus reakció számára alkalmas oldószernek bizonyult. (Ismert, hogy a [bmim]PF₆ magas hőmérsékleten bomlást szenvedhet [9], kísérleteim során azonban sem a szakaszos, sem a folyamatos méréseknél nem tapasztaltam erre mutató jeleket.) Erős befolyással volt a hozamra az ecetsav : etanol mólarány [Hernández, 2006; Karra-Chaabouni, 2006]. Ekvimoláris elegyből kiindulva 24 h reakcióidő után is csak 40% észter hozamot értem el, az alkohol mennyiségét növelve nőtt az elért hozam, 1 : 3 sav : alkohol mólarány fölött gyakorlatilag nem emelkedett tovább, így a továbbiakban itt is ezt az értéket alkalmaztam.

A várakozásnak megfelelően igen erős hatással volt a reakció lefutására a reakcióelegy kiindulási víztartalma [Wasserscheid, 2002; Swetlowski, 2006], melynek értékét 0.5 – 5.0% között változtattam. A kezdeti reakciósebesség a víztartalom növekedésével 3%-ig nőtt, 5%-nál azonban már jelentős csökkenést mutatott. Ebben a tartományban az elért észter hozam közel állandó, 90% körüli érték volt. Ez azzal magyarázható, hogy a legkisebb víztartalom esetében a reakció kezdetén még nincs jelen az enzim működéséhez feltétlenül szükséges vízmennyiség [Wasserscheid, 2002; Swetlowski, 2006], ezt azonban idővel pótolja a reakcióban keletkező és a reakcióelegy víztartalmát növelő víz.

A reakció hőmérsékletének emelése egyértelműen növelte mind a kezdeti reakciósebességet, mind pedig az adott idő alatt elért hozamot. Ismeretes, hogy a [bmim]PF₆ ionos folyadék alkalmazása növeli a CALB enzim termotabilitását [17]. Céлом az integrált rendszer alkalmazhatóságának bizonyítása volt ionos folyadék oldószer alkalmazásakor, ezért reakcióhőmérsékletnek a 40 °C-t választottam, amikor is

a szakaszos rendszerben 5 óra alatt 86%-os etil-acetát hozamot értem el. Az alkalmazott enzim koncentrációját a 2-20 g/dm³ tartományban vizsgáltam és a 10 g/dm³ koncentráció bizonyult a hozam szempontjából optimális értéknek.

Az első pervaporációs kísérletekben az alkalmazott két membrán legfontosabb jellemzőit (fluxus és szelektivitás) határoztam meg a reakcióelegy várható összetételének megfelelő modell oldatok segítségével. A modell oldatok összetételét kétóránként elemeztem, majd 8 óra elteltével meghatároztam a hidrofil illetve hidrofób membránok alkalmazásakor kapott permeátumok összetételét. Az ezekből az adatokból számított fluxus (J) értékeket a 3.13. táblázatban foglaltam össze [51].

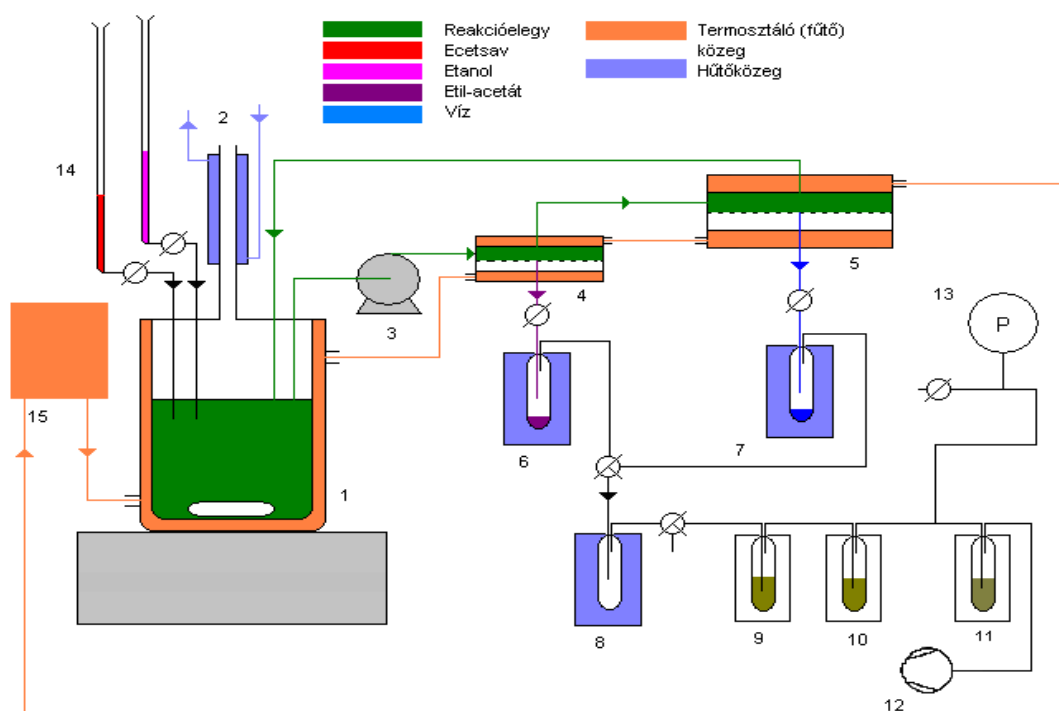
3.13. táblázat: A hidrofil és hidrofób membránok alkalmazásával elért fluxusok.

KOMPONENS	J (mol/m ² ×h)	
	Hidrofil membrán	Hidrofób membrán
Ecetsav	0.004	0.095
Etanol	0.010	0.581
Etil-acetát	-	7.505
Víz	0.448	-

Látható, hogy a két membránon keresztül megfelelő fluxussal eltávolítható volt mind a víz, mindpedig az etil-acetát, ugyanakkor a többi komponens mennyisége (etanol, ecetsav) nagyságrenddel alacsonyabb volt, ami azt mutatja, hogy a vizsgált membránok fluxusa és szelektivitása megfelelő volt a tervezett integrált rendszerhez. E kísérletekben nem volt célom a pervaporációs berendezés működéséhez szükséges optimális paraméterek meghatározása, csupán azt akartam bizonyítani, hogy két pervaporációs berendezés alkalmazásával biztosítható a folyamatos észterezés. A vizsgálatok során azt is megállapítottam, hogy - az irodalmi adatok alapján a várakozásoknak megfelelően – az alkalmazott membránok teljes mértékben visszatartották az ionos folyadékot [Izak, 2005].

A szakaszos kísérletek után kialakítottam a folyamatos működésű berendezést (3.24. ábra), ahol a pervaporációs egységek segítségével egyidejűleg távolítottam el a képződő vizet és etil-acetátot. A reaktorból (1) a reakcióelegyet tygon csővezetéken át perisztaltikus pumpával (3) emeltem át a membrán modulokra. A keringetési sebesség 50 cm³/min volt. A keringetett elegy először egy 12 cm² területű Sulzer gyártmányú „Pervap 2255-50” típusú hidrofób (4), majd egy 200 cm² területű szintén Sulzer

gyártmányú és „Pervap 2201” típusú hidrofil membránra (5) került. A saválló acélból készült membrán modulokat vízfűtéssel termosztáltam (15). A membránmodulokról a reakcióelegyet egy tygon csővezetéken át visszavezettem a reakcióedénybe.



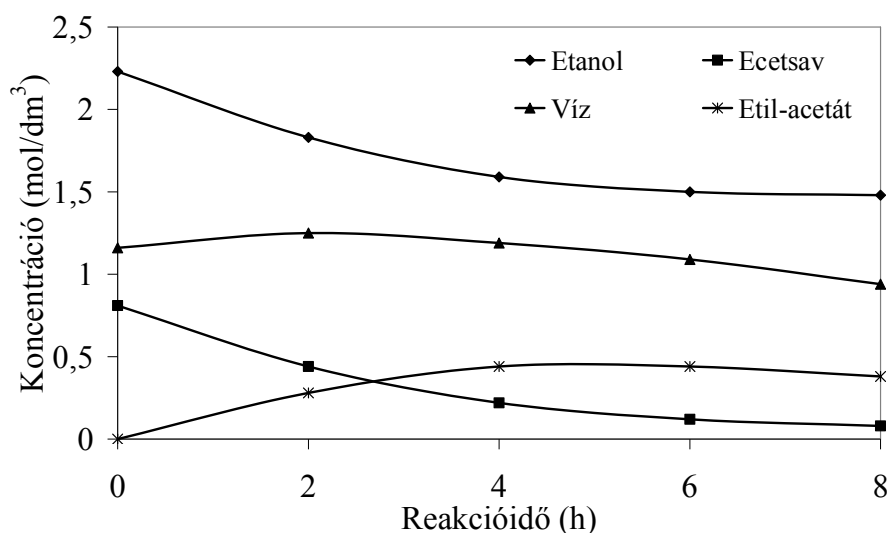
3.24. ábra: Integrált rendszer az etil-acetát folyamatos üzemű előállításának vizsgálatára.

1-reakcióedény mágneskeverővel, 2-intenzív hűtő, 3-perisztaltikus pumpa, 4-hidrofób membrán, 5-hidrofil membrán, 6,7-hűtött csapdák, 8-kifagyasztó, 9,10-szilikonolajos csapdák, 11-zeolitos adszorber, 12-vákuumszivattyú, 13-manométer, 14-szubsztrát adagoló buretták, 15-termostát.

A membrán szekunder oldalán kb. 10 Hgmm (1.3 kPa) vákuumot alkalmaztam, melyet vákuumszivattyú (12) állított elő. A (6) csapdát –melyben a reakcióelegyből kivont etil-acetát kondenzálódott– acetonos szárazjéggel (-70°C), míg a (7) csapdát –melyben a víz kondenzálódott– sós jéggel (-14 °C) hűtöttem. Biztonsági okokból az illékony anyagok teljes eltávolítására egy további kifagyasztót (8) valamint két szilikonolajos csapdát (9,10) illesztettem be a vákuumszivattyú elé. A szivattyú további védelmére egy zeolitos adszorber (11) szolgált. A rendszerben lévő vákuumot (13) higanyos manométerrel mértem. A folyamatos rendszer vizsgálatánál a szubsztrát (etanol és ecetsav) rátáplálását burettákból (14) hajtottam végre. A reakcióedény és a membránmodulok hőmérsékletét termostát (15) által keringetett vízzel állítottam be.

A reakciót [bmim]PF₆ ionos folyadékban, 40 °C hőmérsékleten, 10 g/dm³ enzim koncentráció mellett végeztem, 1:3 sav/alkohol molarány és 2% víztartalom mellett. A

reakciót az enzim hozzáadásával indítottam és ezzel egyidőben működésbe hoztam a pervaporációs egységeket is. Az első kísérletek során még nem alkalmaztam szubsztrát (etanol, ecetsav) betáplálást. A koncentrációk változását az idő függvényében a 3.25. ábrán tüntettem fel. Megfigyelhető, hogy a nagy kezdeti reakciósebességek miatt az etil-acetát koncentrációja a reakció első öt órájában kb. 0.45 mol/dm^3 értékig növekedett, majd enyhe csökkenés után állandó értékre állt be. Ugyanakkor a reakcióelegy víztartalma már 2 óra után csökkenést mutatott, ami arra utal, hogy az enzim hidratáltsági foka kiinduláskor nem volt megfelelő, és az enzim is kötött meg a reakcióban képződő vízből. A kísérletek alapján megállapítottam, hogy a hidrofíl és a hidrofób membrán elegendő volt a reakcióban képződött etil-acetát és víz eltávolítására.



3.25. ábra: A koncentrációk változása az idő függvényében folyamatos termékeltétel mellett.

($T = 40^\circ \text{C}$, sav/alkohol mólarány = 1:3, enzim koncentráció = 10 g/dm^3)

A munka következő lépéseként a reagált szubsztrátokat fogyasztásuk ütemében pótoltam, így a termékek eltávolításával együtt folyamatos működésű rendszert alakítottam ki. A cél egy olyan stacionárius állapot kialakítása volt valamennyi komponensre, ahol koncentrációjuk csak minimális mértékben változott a reakció során. A komponensek koncentrációjának változását az idő függvényében a reakció első 24 órájában a 3.26. ábra mutatja, ahol feltüntettem az egyes anyagok elérni kívánt koncentrációját is. A kísérletet 72 óra hosszan tovább folytatva megállapítottam, hogy az egyes komponensekre megkívánt koncentráció értékeket folyamatos működés esetén nagy pontossággal tartani lehetett, s mindeközben az enzim aktivitása nem változott [68, 70]. Az enzim stabil aktivitása egyrészt az ionos folyadék enzim stabilizáló hatásának, másrészt annak köszönhető, hogy az inhibíciót okozó ecetsav koncentrációt igen

alacsony értéken tudtam tartani. Kísérleteim bizonyították, hogy a két pervaporációs egység alkalmas a termékek folyamatos eltávolítására és így ionos folyadék oldószerben folyamatos enzimkatalitikus észterezés valósítható meg [53, 65].

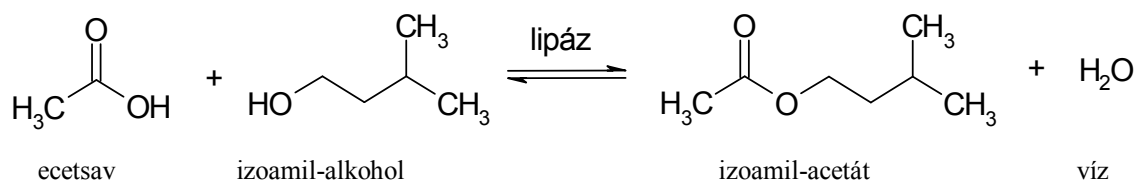


3.26. ábra: A reakcióelegy összetételének változása az idő függvényében a folyamatos működésű berendezésben.

($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, sav/alkohol mólarány = 1:3, enzim koncentráció = 10 g/dm^3)

3.2.2. Izoamil-acetát előállításának vizsgálata nem konvencionális közegű enzimkatalitikus reakcióval

Az etil-acetát előállítás vizsgálatát követően egy másik természetes aromaanyag, az izoamil-acetát előállítását vizsgáltam enzimátikus úton, különböző reakcióközegekben. A szubsztrátokként alkalmazott, természetes forrással rendelkező ecetsav és izoamil-alkohol reakcióját a *Candida antarctica* lipáz B enzim katalizálta az általam végrehajtott kísérletekben. Ez egyensúlyra vezető észterezési folyamat, amelynek termékei izoamil-acetát és víz.



Ezen aroma-komponens előállítását tanulmányoztam több nem-konvencionális, környezetbarát reakcióközegben: ionos folyadékban, szuperkritikus szén-dioxidban és oldószermentes közegben. Alapvető eltérés az etil-acetáthoz képest, hogy ionos folyadékban ez esetben kétfázisú rendszerben kellett dolgozni.

3.2.2.1. Izoamil-acetát enzimátikus előállítása ionos folyadékban [21, 23, 24, 73,80, 81]

Az első vizsgált reakcióközeg az izoamil-acetát biokatalizált előállítására az ionos folyadék volt. Ehhez először ki kellett választani a megfelelő ionos folyadékot, vizsgálni a komponensek megoszlását a fázisok között, majd számos paraméter tanulmányozása következett, úgymint: hőmérséklet, enzim-koncentráció, kezdeti víztartalom, alkohol - sav molarány, alkohol - ionos folyadék térfogatarány, rázatási intenzitás hatása, visszaforgatás hatékonysága.

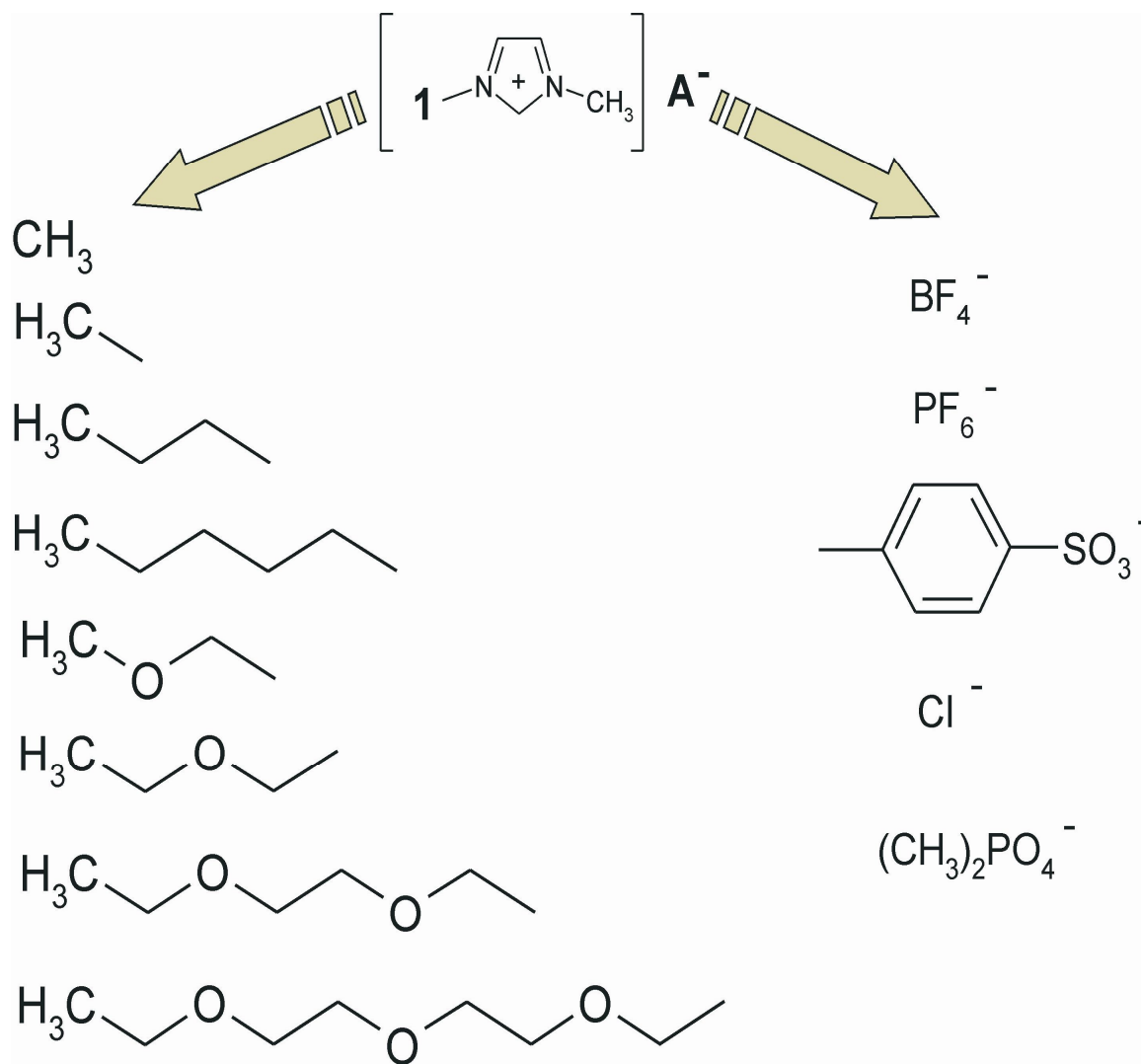
A reakció optimalizálásának első lépéseként a megfelelő oldószer kiválasztásához előzetes reakciókban tízféle ionos folyadékot vizsgáltam: [emim]tosy, [bmim]Cl, [m₂im]PO₄(CH₃)₂, [bmim]BF₄, [bmim]PF₆, [hmim]PF₆, VACEM42, VACEM44, VACEM47, VACEM58 (2.2. táblázat). Ezek mindegyike imidazolium-kationt tartalmazott, mert irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy ezek a típusú ionos folyadékok a legalkalmasabbak észterezési, átészterezési reakciókra [Jain, 2005]. A kapott eredményeket a 3.14. táblázatban foglaltam össze. Az imidazolium gyűrű 1-es helyzetű szubsztituense 8-féle (metil, etil, butil, hexil, metoxi-etil, etoxi-etil, etoxi-etoxi-etil, etoxi-etoxi-etoxi-etil), míg az anion 5-féle volt (BF₄, PF₆, tozilát, klorid, dimetil-

3.14. táblázat: Imidazolium típusú ionos folyadékok tesztreakcióinak eredményei.
Reakció körülmények: 110.0 mmol izoamil-alkohol; 2.2 mmol ecetsav; 0.85 mmol víz; 9.7 mg Novozym 435; 1.38 g ionos folyadék; 40 °C; 100 rpm; 16 h.

NÉV	FÁZISOK SZÁMA	HOZAM (%)
[emim]tosy	1	-
[bmim]Cl	1	-
[m ₂ im]PO ₄ (CH ₃) ₂	1	-
[bmim]PF₆	2	90.5
[bmim] BF ₄	2	0,0
[hmim]PF₆	2	89.7
VACEM42	2	19.5
VACEM44	2	18.3
VACEM47	2	19.5
VACEM58	2	20.8

foszfát). Így kihasználva az ionos folyadékok variálhatóságát, sikerült feltérképeznem, hogy melyik imidazolium típusú ionos folyadék a legmegfelelőbb az általam vizsgált reakcióra (3.27.ábra).

A vizsgált tízféle ionos folyadékból hét esetben kaptam kétfázisú rendszert, ezek közül kettőben, a [bmim]PF₆-ban és a [hmim]PF₆-ban igen ígéretes hozamot tapasztaltam. Meglepő eredmény, hogy a [bmim]BF₄ ugyan kétfázisú rendszert alkotott, de reakció nem játszódott le benne. Ebből az a következtetés vonható le, hogy ez az ionos folyadék valószínűleg inaktíválja a fázishatáron elhelyezkedő immobilizált enzimet. Az ionos folyadékok vízóldhatóságáért az anionok a felelősek, így az azonos kationnal rendelkező [bmim]PF₆ és [bmim]BF₄ összevetéséből kiderül, hogy míg az előbbi vízzel nem elegyedik, addig az utóbbi korlátlan mértékben oldható vízben.



3.27. ábra: A vizsgált ionos folyadékok áttekintése.

A hidrofil [bmim]BF₄ sok esetben elvonja az enzimtől az aktív konformációjának felvételéhez szükséges felületi vízréteget, ezáltal inaktíválva az enzimet [van Rantwijk, 2007], ugyanakkor alkalmas más enantioszelektív reakciók közegének [18].

Az imidazolium-gyűrű oldalláncaiban éter-kötéseket tartalmazó VACEM ionos folyadékok esetén azt vizsgáltam, hogy nemkötő elektronpárral rendelkező O-atomok bevitelével nő-e a kialakuló H-kötések száma, ami fokozott enzim aktivitást, stabilitást váltana ki. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy az ionos folyadék rendezett, háromdimenziós szerkezetének kialakításáért felelős H-kötések az imidazolium-gyűrű H-atomjai és az anionok nagy elektronegativitású, nemkötő elektronpárral rendelkező atomjai között jönnek létre, nem pedig a gyűrű oldalláncaiban lévő atomok között [Dupont, 2004; Lozano, 2005]. Ráadásul, az éter kötések jelenléte kismértékben növelte a VACEM ionos folyadékok hidrofilitását, ami a [bmim]BF₄ esetéhez hasonlóan szintén dezaktiváló hatású. A VACEM44 és VACEM47 esetén melléktermék képződést is tapasztaltam, ami azt jelenti, hogy az éter kötések számának és/vagy az oldallánc hosszúságának növelésével az enzim szelektivitása is csökkent.

A két gyakorlatilag azonos eredményt adó [bmim]PF₆ és [hmim]PF₆ ionos folyadék közül a további vizsgálatokhoz [bmim]PF₆-ot használtam kedvezőbb árfekvése miatt ([bmim]PF₆: 2570 €/5 kg, [hmim]PF₆: 3180 €/5 kg) [IoLiTec, 2008].

Mivel a reakcióelegy kétfázisú, meg kellett vizsgálni az egyes komponensek megoszlását az alkoholos és az ionos folyadékos fázis között. Először az alkohol ionos folyadékban való oldhatóságát kellett ellenőrizni. Az izoamil-alkohol nagyon kis mértékben oldódik [bmim]PF₆-ban (kb. 1% 30-60 °C között, K<0,01), ezért a további számításokban az alkoholos és ionos folyadékos fázisokat két különálló, egymással nem elegyedő egységként kezeltem [69, 71].

Ezek után 30, 40, 50 és 60 °C-on vizsgáltam az ecetsav és az izoamil-acetát megoszlását a két fázis között (3.15. táblázat). Az ecetsav megoszlása elhanyagolható mértékben változott a hőmérséklettel a vizsgált tartományban. Mindegyik hőfokon 30%-a az ionos folyadékos fázisban volt. Mivel az enzim a két fázis közötti határfelületen helyezkedett el, ezért az izoamil-alkohol molekulák nagy része a szerves fázisból diffundált az enzim aktív helyeihez, míg az ecetsav esetén ez mindkét fázisból történhetett. A termék megoszlása a két fázis között már erősen hőmérsékletfüggő volt. Legkisebb mértékű megoszlás (K<0,05) 50 °C-on volt, ekkor az izoamil-acetát 96.9%-a

3.15. táblázat: A reakció komponenseinek megoszlása [bmim]PF₆ és izoamil-alkohol között

T (°C)	izoamil-alkohol		ecetsav		izoamil-acetát	
	K*	m/m%**	K	m/m%**	K	m/m%**
30	0.005	0.9	0.354	28.2	0.782	45.3
40	0.007	1.2	0.392	30.4	0.146	14.4
50	0.008	1.5	0.428	32.4	0.050	3.1
60	0.007	1.4	0.443	32.2	0.542	39.5

*Maximális oldhatóság [bmim]PF₆-ban.

**Az ionos folyadékos fázisban.

az alkoholos fázisban helyezkedett el. Ennek később, a reakcióelegy elválasztása során volt jelentősége, mert ezen a hőmérsékleten nyerhető ki a legtöbb termék a felső fázisból.

Az enzim-koncentráció hatásának vizsgálatához 6.9 – 135.8 g/dm³_{reakcióelegy} között változtattam az enzim mennyiségét és vizsgáltam a reakció lefutását (3.16. táblázat). A hozam-idő függvények minden esetben telítési görbét adtak. Az enzimmennyiségének növelésével az egyensúlyi hozam nem változott, de eléréséhez rövidebb idő volt szükséges. A 3.16. táblázat adataiból látható, hogy ionos folyadékot tartalmazó rendszerben 68.5 g/dm³_{reakcióelegy} fölé növelve az enzim mennyiségét a reakcióidő nem csökkent tovább, sőt emelkedett. A kezdeti reakciósebesség pedig csökkent, tehát az enzim fajlagosan kevésbé volt hatékony a töményebb oldatokban.

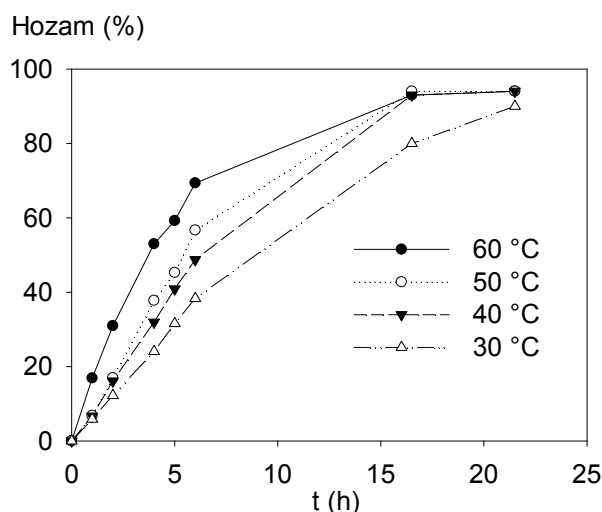
3.16. táblázat: Az enzim-koncentráció hatása a hozamra, reakcióidőre és a kezdeti reakció-sebességre

Reakció körülmények: 36.8 mmol izoamil-alkohol; 7.34 mmol ecetsav; 5.67 mmol víz; 1.38 g ionos folyadék; 20 °C; 200 rpm.

c _{enzim} (g/dm ³ _{reakcióelegy})	6.9	34.9	49.8	68.5	135.8
hozam (%)	74	76	75	75	75
t (h)	30	24	5	5	6
v _k (mmol _{acetát} /g _{enzim} ×h)	14.7	2.1	1.8	1.5	0.3

Összegezve elmondható, hogy optimális enzimmennyiséget az adott körülmények határozzák meg. Kinetikai vizsgálatokhoz a nagy kezdeti reakciósebességhez vezető, kis enzimmennyiség használata az ideális, de ipari körülmények között, ahol a cél a termék gyors, gazdaságos előállítása nagyobb enzim-koncentráció használata célszerű. Emellett figyelembe kell venni, hogy van egy határérték (ionos folyadékban: 50 g/dm³_{reakcióelegy} (saját eredmény), n-hexánban: 13.8 g_{enzim}/dm³_{alkohol} [Romero, 2005a]), ami fölé nem érdemes menni.

Az izoamil-acetát képződés hozam-idő görbáját 30, 40, 50 és 60 °C-on mutatom be (3.28. ábra). 16.5 h után 30 °C-on megközelítette, a többi három hőfokon pedig elérte az átalakulás mértéke az aktuális egyensúlyi hozamot (95%). A kezdeti reakciósebesség értéke folyamatosan változott, értéke közel kétszeresére növekedett, miközben a hőmérsékletet 30 °C-ról 60 °C-ra növeltem [72].



3.28. ábra: A reakció időbeli lefutása különböző hőmérsékleteken.

Reakció körülmények: 36.75 mmol izoamil-alkohol, 7.34 mmol ecetsav, 2.83 mmol víz, 32.4 mg Novozym 435. 1.38 g [bmim]PF₆, 150 rpm.

Az enzim magas hőmérsékleten tapasztalt jó működése nem meglepő, hiszen irodalmi adatok alapján ismert, hogy a Novozym 435-nek magas a hőtűrő képessége [Romero, 2005a]. Az alkalmazott [bmim]PF₆ ionos folyadék bomlásáról néhány közlemény jelent meg, amelyben ezen ionos folyadék magas hőmérsékleten bekövetkező instabilitásáról számolnak be, főleg savas hidrolízisek esetén [Wasserscheid, 2002; Swatloski, 2003]. Ekkor a PF₆⁻-anionból különböző korrozív gázok (HF, POF₃) fejlődnek, miközben fluorid-monohidrát ([bmim]F×H₂O) kristályos termék marad vissza, amit röntgen-krisztallográfiával azonosítottak. Tehát a bomlás magas hőmérsékleten játszódik le és egyértelmű jele a kristályok megjelenése. Munkám során nem tapasztaltam kristályok megjelenését 60 °C-on 24 h után, valamint a visszaforgatás alatt 50 °C-on tíz cikluson keresztül, illetve a 60-70-80 °C-on történő enzim inaktivációs vizsgálatok során sem. Az eddig bemutatott eredmények alapján optimális értéként az 50 °C-os hőmérsékletet (ezentúl munkahőmérséklet) választottam ki, mert itt a termék 96%-a a felső alkoholos fázisban van, nem lép fel bomlás, a reakció gyorsan, jó hozammal játszódik le, az enzim inaktiválódása kismértékű.

Az Arrhenius-egyenlet alapján meghatároztam az aktiválási energia értékét izoamil-acetát ecetsavból és izoamil-alkoholból [bmim]PF₆ ionos folyadékban történő előállítására, ami 15.7 kJ/mol-nak adódott. A kapott eredményt oldószermentes közegre számított adatokkal összehasonlítva (28.8 kJ/mol) azt láthatjuk, hogy ionos folyadékban a reakció lejátszódásához kisebb potenciálgáton kell áthaladni [Güvenc, 2002]. Szerves reakcióközegre, konkrétan erre a reakcióra az irodalomban nem található adat, csak ecetsav-anhidrid szubsztrát esetén n-hexán oldószerben: 11.3 kJ/mol [Romero, 2005a]. Ez az adat nem meglepő, hiszen ecetsav-anhidrid szubsztráttal gyorsabban játszódik le a reakció [Hari Krishna, 2001; Romero, 2005a; Romero, 2005b], de mégsem előnyös az alkalmazása, hiszen előállítása szintetikus úton történik (acetaldehidből oxidációval vagy ecetsavból és acetonból keténe át [Furka, 1991]).

Mivel az izoamil-alkohol és az ecetsav bioszintézise egyensúlyra vezető folyamat, ezért szubsztrátfelesleggel az egyensúlyt az észterképződés irányába lehet eltolni. A sav és az alkohol feleslegének a hatását különböző mólarányoknál vizsgáltam meg (3.17. táblázat).

3.17. táblázat: A sav - alkohol mólarány változásának hatása a hozamra és a kezdeti reakciósebességre. A szubsztrát koncentrációk értékei különböző arányoknál.

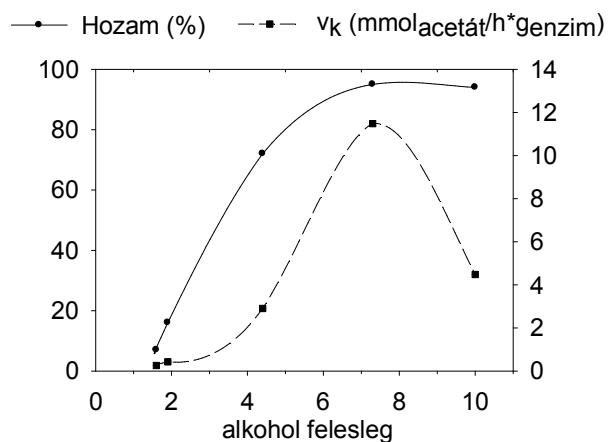
Reakció körülmények: 10.85-10.85-11.49-14.03-31.83-53.26-73.42 mmol izoamil-alkohol; 36.69-21.66-7.34-7.34-7.34-7.34-7.34 mmol ecetsav (ebben a sorrendben); 5.67 mmol víz; 38.0 mg Novozym 435; 1.38 g ionos folyadék; 50 °C; 150 rpm; 48 h.

sav:alkohol mólarány	3.4:1,0	1.9:0	1.0:1.6	1.0:1.9	1.0:4.4	1.0:7.3	1.0:10.0
C_{ecetsav} (mol/dm ³)*	10.84	8.37	4.08	3.58	1.83	1.16	0.86
$C_{\text{izoamil-alkohol}}$ (mol/dm ³)*	3.21	4.43	6.51	6.83	7.98	8.43	8.62
hozam (%)	Homogén		7	16	72	95	94
v_k (mmol _{acetát} /g _{enzim} ×h)			0.259	2.431	2.903	11.483	4.480

*A koncentrációk a felső, alkoholos fázisban.

Az alkohol koncentráció növekedésével a hozam telítési görbe mentén változott (3.29. ábra). A maximális egyensúlyi hozamot (95%) hétszeres mólfeleslegnél értem el, további izoamil-alkohol hozzáadására nem emelkedett a hozam. A kezdeti reakciósebesség növekvő alkohol koncentráció hatására egy optimum görbét vett fel, amelynek legnagyobb értéke (11.5 mmol_{acetát}/g_{enzim}×h) szintén 7-szeres alkohol feleslegnél volt. Az izoamil-alkohol feleslegének pozitív hatása a hozamra és kezdeti reakciósebességre ismert az irodalomból szerves oldószerekben [Vija, 1997; Hari Krishna, 2001; Romero,

2005a], oldószermentes közegben [Güvenc, 2002; Güvenc, 2007] és szuperkritikus CO₂-ban is [Vija, 1997; Romero, 2005b].



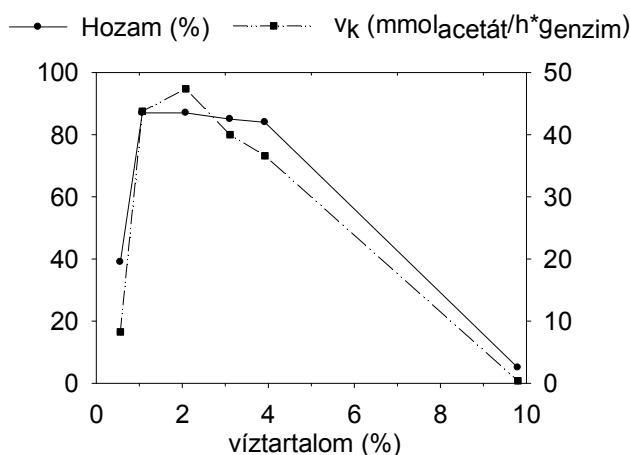
3.29. ábra: A hozam és a kezdeti reakciósebesség változása az izoamil-alkohol feleslegének függvényében.

X tengely: 1 mol savra jutó alkohol mennyiség mol-ban kifejezve.

Fontos megvizsgálni, hogy az elért eredmények milyen szubsztrát koncentrációkra vonatkoznak, mert az eddigi szerves oldószerben történő izoamil-acetát szintézisek során csak alacsony szubsztrát koncentrációknál (<0.18 mol/l) érték el megfelelő termékképződési arányt (80%) [Vija, 1997; Hari Krishna, 2001]. Oldószermentes közegben már magasabb ecetsav koncentrációnál (3.6 mol/l) is elérték a 80%-os hozamot [Güvenc, 2002].

A 3.17. táblázatban feltüntettem a különböző sav - alkohol molarányok mellett az egyedi szubsztrát koncentrációkat is. Látható, hogy ionos folyadék alkalmazása esetén magas ecetsav koncentrációnál (kb. 1.6 mol/l) érhető el a 80% körüli érték, ami egy nagyságrenddel töményebb oldat savra nézve, mint szerves oldószerekben. Oldószermentes közeghez képest előnyét az jelenti, hogy az egyensúlyi koncentráció értéke nem 80%-nál van, hanem eléri a 95%-ot, jóllehet magasabb izoamil-alkohol felesleg jelenlétében. Ennek magyarázatára az enzim inaktivációs mérések eredményei szolgálnak.

Kísérleteim során a kiindulási reakcióelegyhez különböző mennyiségben (0.5-30%-ban) vizet adtam és vizsgáltam a bekövetkező változásokat. Az oldószermentes közegben mértekhez hasonlóan [Ghamgui, 2006] mind a hozam, mind a kezdeti reakciósebesség esetén optimum görbét kaptam a kezdeti víztartalom függvényében (3.30. ábra).



3.30. ábra: A hozam és a kezdeti reakciósebesség változása a víztartalom függvényében.

Reakció körülmények: 32.54 mmol izoamil-alkohol, 7.34 mmol ecetsav, 1.39-2.78-5.56-8.33-11.11-27.78 mmol víz; 38.0 mg Novozym 435; 1.38 g ionos folyadék; 50 °C; 150 rpm, 24 h.

Amikor a hozzáadott víz mennyisége 10% felett volt, a reakcióelegyből opálos szuszpenzió képződött és észterképződés nem volt kimutatható. Az egyensúlyi hozam értékét (87%) 1 és 4% kezdeti víztartalom között értem el, a kezdeti reakciósebesség maximális értéke pedig 1 és 2% között volt. Az optimum görbék felszálló ágában (méréseim során 1-től 2%-ig) nő az enzim hidratáltságának foka. Az enzim körüli egyre nagyobb vízköpeny csökkenti az ecetsav inhibíáló hatását [Ghamgui, 2006]. A leszálló ágban a víz egyensúlyt visszafelé toló hatása érvényesül, valamint immobilizált enzimekre kifejtett inhibíáló hatását is közölték már [Camacho, 2003]. Ekkor a vízmolekulák eltömik az immobilizált enzim hordozójának pórusait és így a szubsztrát molekulák nem érik el az enzim aktív centrumait.

Az ionos folyadék-alkohol térfogat arányt vizsgálva megállapítottam, hogy ahogy növekedett az ionos folyadék térfogataránya, úgy emelkedett a hozam és a kezdeti reakciósebesség. A kezdeti reakciósebesség kétszeres [bmim]PF₆ felesleg esetén volt a legnagyobb, de a reakcióelegy hidrofilitásának megváltozása miatt, kb. 8 h reakcióidő után a két fázis megszűnt és az elegy homogén lett. Ugyanez a jelenség négyszeres ionos folyadék térfogatfelesleg esetén már a reakció kezdetén fellépett. A rendszer legpolárisabb komponense az izoamil-alkohol. Ha ez az anyag 0,5-szörös térfogatarány felett volt jelen, akkor a reakcióelegy kétfázisú, ez alatt egyfázisú volt. A reakció közbeni fázisváltáshoz (1:2 alkohol:ionos folyadék aránynál) az is hozzájárult, hogy a reakció előrehaladtával csökkent az izoamil-alkohol mennyisége, változott a reakcióelegy összetétele. A további kísérleteimet így kétszeres alkohol feleslegben hajtottam végre.

A szakaszos kísérleteket rázóinkubátorban végeztem, a kisméretű reaktorban pedig mágneses keverővel biztosítottam a reakcióelegy kevertetését. Mindkét esetben

szükséges volt az adott kevertetési módszer vizsgálata. Ebben a fejezetben a rázatási intenzitás változtatása során kapott eredményeket ismertetem lombikos reakciókra. Az alkalmazott enzimmennyiség igen magas (300 mg), de még a határérték alatti volt, azért, hogy az enzimet érő kismértékű hatások is kimutathatóak legyenek.

Immobilizált enzimek esetén kétféle diffúziós folyamatot különböztetünk meg, külsőt és belsőt. A belső diffúziós limitáció Novozym 435 esetén nem meghatározó, mert a gyártó adatai alapján az enzim aktivitása nem változik a hordozó részecske- és pórusméretétől [NOVO, 2006].

3.18. táblázat: A rázatási intenzitás hatása a hozamra.

Reakció körülmények: 22.03 mmol izoamil-alkohol; 7.34 mmol ecetsav; 5.83 mmol víz; 2.42 g ionos folyadék; 300 mg Novozym 435, 3 h, 60 °C.

rázatási intenzitás (rpm)	50	100	150	200	250
hozam (%)	85	95	82	77	64

A külső diffúciónak akkor van jelentős szerepe, ha a keverési sebesség befolyásolja a reakciót. Ezt a hatást öt rázatási intenzitás esetén vizsgáltam: 50-100-150-200-250 rpm-nél. A 3.18. táblázat adatai alapján látható, hogy a hozam növekedett 100 rpm-ig, de e fölé növelve a rázatási intenzitást az értéke csökkent.

Ennek a jelenségnek a magyarázata, hogy a görbe felszálló ágában az enzimirészecskék és a szubsztrát molekulák eloszlása egyenletes, kapcsolatuk intenzív. Méréseim során a magasabb rázatási intenzitásoknál az enzim részecskék kitapadását tapasztaltam a reakcióedény falára. Ekkor a reakció jelentős hányada alatt az enzim molekulák bizonyos (változó) mennyisége nem vagy csak kis mértékben vett részt az észterezési folyamatban. A falra tapadás mértékét rengeteg olyan paraméter határozza meg (reakcióelegy-reakcióedény térfogatviszonya, lombik alakja, mérete, anyaga, nedvesedési paraméterek), amit laboratóriumi léptékben nem vizsgálnak részletesen. Ebből következően olyan laboratóriumi edényben érdemes a reakciót végrehajtani, amely nagy alapterületű, alacsony, benne a reakcióelegy minél nagyobb térfogatot foglaljon el. Így a ráztatás megfelelő diszperziót biztosít a molekulák számára és a „fal effektus” visszaszorítható.

Az izoamil-acetát Novozym 435 immobilizált enzimmel ecetsavból és izoamil-alkoholból történő előállítására ionos folyadékban a következőket állapítottam meg:

- alkalmas ionos folyadékok: [bmim]PF₆, [hmim]PF₆,
- határ enzim-koncentráció: 50 g/dm³_{reakciólegy},
- munkahőmérséklet (megoszlás figyelembe vételével): 50 °C,
- optimális izoamil-alkohol és ecetsav molarány: 7:1,
- optimális ionos folyadék mennyiség: 2.66 mol_{[bmim]PF₆}/mol_{ecetsav},
- optimális kezdeti víztartalom: 1-2 m/m%
- megfelelő rázatási intenzitás lombikos kísérletekhez: 100 rpm.

A fenti paraméterekkel végrehajtott reakciónál ~95% egyensúlyi hozam érhető el ~5 h alatt, kb. 20,5 mmol_{acetát}/g_{enzim}×h kezdeti reakció-sebességgel.

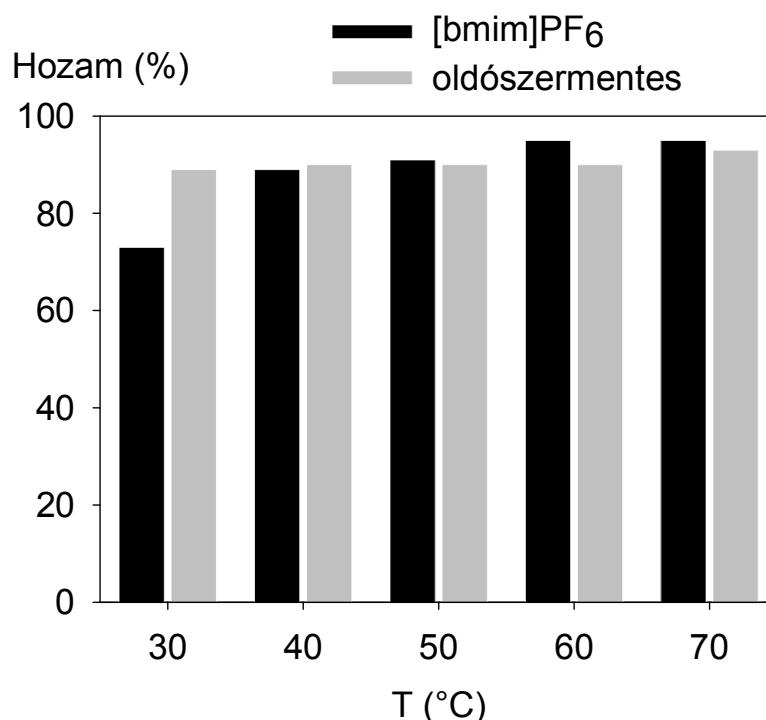
3.2.2.2. Izoamil-acetát enzimátikus előállítása oldószermentes közegben [10, 74, 75]

A másik vizsgált reakcióközeg az izoamil-acetát ecetsavból és izoamil-alkoholból történő enzimátikus előállítására az oldószermentes közeg volt. Ez a szubsztrátként is szerepet játszó izoamil-alkohol feleslegében lejátszatott reakciót jelenti valójában, nem pedig az oldószer teljes hiányát [Welton, 2006]. Kísérleteim során az ionos folyadékos közegre megállapított optimális paraméterekkel dolgoztam, kivéve természetesen a [bmim]PF₆ alkalmazásának hiányát. Így azonos reakció körülmények között hasonlítottam össze a két reakcióközeget hozam és kezdeti reakciósebesség tekintetében (3.19. táblázat és 3.31. ábra).

3.19. táblázat: A kezdeti reakció-sebesség (v_k) értékei különböző hőfokokon ionos folyadékos és oldószermentes közegben.

Közeg	v_k (mmol _{acetát} /g _{enzim} *h)				
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
oldószermentes	16.3	21.3	27.0	35.9	39.6
[bmim]PF ₆	10.0	13.0	20.6	18.7	23.0

Egyensúlyi hozam tekintetében alacsonyabb hőfokokon (30 és 40 °C) az oldószermentes homogén közegben, míg magasabb hőmérsékleteken (60 és 70 °C) az ionos folyadékot is tartalmazó heterogén rendszerben érhető el jobb eredmény. Ez azzal magyarázható, hogy a [bmim]PF₆ viszkozitása folyamatosan csökkent, így az anyagtranszport sebessége pedig nőtt a hőmérséklet növekedésével. A munkahőfokon (50 °C) körülbelül azonos eredmények adódtak. A kezdeti reakciósebesség minden esetben az oldószermentes közegben volt magasabb.



3.31. ábra: Az ionos folyadékos és oldószermentes rendszer összehasonlítása.

Reakció körülmények: 54,21 mmol izoamil-alkohol, 7,34 mmol ecetsav, 3,72 mmol víz; 38 mg Novozym 435; 8,14 g ionos folyadék (a megfelelő reakciókban); 30-70 °C; 100 rpm, 24 h (magasabb hőmérsékleteken hamarabb beállt az egyensúly).

A fenti kísérleti paraméterekkel messzemenően jobb értékeket lehet elérni az irodalomban található legjobb eredményekhez képest. Güvenc és kutatócsoportja szintén ecetsav szubsztrát alkalmazása mellett 50 °C-on 22,61 mmol_{acetát}/g_{enzim}*h kezdeti reakció-sebességet ért el (itt: 27,027 mmol_{acetát}/g_{enzim}*h), valamint az elért legmagasabb egyensúlyi hozam 80% volt 6 h reakcióidő után (itt: 95%, 5h). Ezen eredmények alapján az látszik, hogy alacsonyabb hőfokon az oldószermentes közeggel (89%), magasabb hőfokon az ionos folyadékos rendszerrel lehet magasabb egyensúlyi hozamot elérni (95%), a kezdeti reakció-sebesség értéke pedig minden esetben az oldószermentes közegnél nagyobb.

3.2.2.3. Izoamil-acetát enzimatisz előállítása szuperkritikus szén-dioxidban és kombinált eljárásban [74, 78]

Méréseim során az ionos folyadékos és oldószermentes közegnél is alkalmazott paraméterekkel hajtottam végre kísérleteket s.k. CO₂-ban. Mivel a reakcióelegy összetétele és a hőmérséklet már adott volt, a nyomás hatását vizsgáltam meg a reakcióra (3.20. táblázat). A hozam lineárisan növekedett a nyomás növelésével 100 és 300 bar között, ellentétben az irodalommal, ahol nem találtak jelentős változást a hozamban a nyomás növelésére [Knez, 2002; Romero, 2005b]. Hasonlóképpen változott a kezdeti reakciósebesség is a nyomás

függvényében a vizsgált tartományban. Szinte minden közleményben a kezdeti reakciósebesség csökkenéséről számolnak be a nyomás függvényében [Rantakylä, 1994; Yoon, 1996; Fontes, 1998], csak nagyon kevés eset van, amikor ennek ellentettjét tapasztalták [Steyter, 1991]. Ezek az eredmények azonban mégsem helytelenek, mert s.k.F.-ban a nyomás (és más működési paraméterek) hatása a biokonverzióra igen összetett. Nagyon magas nyomáson (és hőmérsékleten) az enzim szerkezetében következnek be változások [Nakamura, 1990]. Alacsonyabb nyomásokon többféle hatás érvényesül, amelyek ellentétes következményekkel járnak. Állandó térfogat mellett növelve a nyomást a reaktánsok móltörtje csökkent, tehát csökkent a kezdeti reakciósebesség. Másrészt a nyomás növelésével nőtt a reagáló anyagok oldhatósága, ami növeli a kezdeti reakciósebességet [Romero, 2005b]. Az oldhatóság egy telítési görbe mentén változik, lassulása a kritikus nyomás körül kezdődik. Emellett a fizikai paraméterek (sűrűség, dielektromos állandó, kompressziótűrés), amelyek az anyagtranszportra is hatással vannak, folyamatosan változnak a nyomással [Kamat, 1995; Jessop és Leitner, 1999].

3.20. táblázat: A hozam, a kezdeti reakció-sebesség és a fázisok számának változása a nyomás függvényében s.k. CO₂-ban.

Reakció körülmények: 54.21 mmol izoamil-alkohol; 7.34 mmol ecetsav; 3.72 mmol víz; 38 mg Novozym 435; 5 h; 50 °C.

Közeg	s.k. CO ₂		
	100 bar	200 bar	300 bar
hozam (%)	8	11	14
v_k (mmol _{acetát} /g _{enzim} ×h)	3.2	4.4	5.7
fázisok száma	2	1	1
fázisok összetétele	gáz –foly. CO ₂	foly. CO ₂	foly. CO ₂

Összehasonlítva a s.k. CO₂-ban elért eredményeket, az ugyanolyan körülmények között ionos folyadékban elért hozammal és kezdeti reakciósebességgel (3.17. táblázat) látható, hogy sokkal kisebb értékeket kaptam. 5 h reakcióidő után még a kezdeti lineáris tartományba eső, 10% körüli hozamot értem el. Vija és munkatársai ammónium-acetátot alkalmaztak acil-forrásként, mert ecetsavval egyáltalán nem tapasztaltak reakciót s.k. CO₂-ban [Vija, 1997]. Ehhez képest később Romero és kutatócsoportja 58% hozamot kapott ecetsavval, bár az acil-donorok vizsgálata során kimutatták, hogy ecetsav-anhidriddel 1,5-szer nagyobb hozamot lehet elérni. Az irodalomban nem található magyarázat arra, hogy az ecetsavval s.k.F.-okban izoamil-acetát előállításánál miért tapasztaltak alacsony észterezési fokot [Vija, 1997; Romero, 2005b].

A hozam és a kezdeti reakciósebesség növelésére s.k.F./ionos folyadék kombinált közegben is hajtottam végre kísérleteket a legmagasabb vizsgált nyomáson. Mivel [bmim]PF₆-ban korlátozottan oldódik a CO₂, ezért ez a rendszer az ionos folyadék és a s.k. CO₂ alkotta két fázisból állt, ahol az alsó fázis a [bmim]PF₆ volt. Mindkét közeg munkafázisként szerepelt a reakció során, majd a s.k. CO₂ a reakció végén extraktív fázis is lett [Hernández, 2006]. Az enzim itt is a két fázis közötti határfelületen helyezkedett el. A [bmim]PF₆ hozzáadására azonban csökkent a hozam és a kezdeti reakciósebesség is. Pozitív hatást eredményezhetett volna az enzim stabilizációjának növekedése ionos folyadék hatására. A megvalósuló negatív befolyást valószínűleg az oldhatósági viszonyok megváltozása okozta. Ha az egyik reaktáns nagymértékben átoldódik az ionos folyadékos fázisba, míg a másik főleg a s.k. fázisban van jelen, akkor a szubsztrát koncentrációk ellentétes irányú változása miatt csökken a reagáló molekulák száma. Ezt a hipotézist a reakcióban részt vevő anyagok megoszlásának vizsgálata [bmim]PF₆ és s.k. CO₂ között támaszthatná alá vagy cáfolhatná meg, ilyen adatok azonban egyelőre nem állnak rendelkezésre.

3.2.2.4. Az enzim hőstabilitásának vizsgálata [23, 76, 77, 78, 79]

Az izoamil-acetát ecetsavból történő biokatalízise során a legjobb hozamokat és kezdeti reakciósebességet oldószermentes közegben és ionos folyadékban kaptam. Az azonos körülmények alkalmazása lehetővé tette a fenti reakcióközegek valós összehasonlítását, ami eddig még nem történt meg az irodalomban. Mivel a fent említett két közegben hasonló eredményeket értem el, ezért a legmegfelelőbb reakcióközeg kiválasztásához további vizsgálatokra volt szükség.

A Novozym 435 hőmérséklet stabilitását a két legjobb közegben, oldószermentes és [bmim]PF₆-ot tartalmazó rendszerekben vizsgáltam különböző hőfokokon. A kísérletek helyes kivitelezéséhez először egy megfelelő mosási procedúrát kellett kidolgozni az ionos folyadékos rendszerben végzett mérésekhez. Az inkubálás után, az aktivitás mérése előtt az enzim részecskékről a rájuk tapadt [bmim]PF₆-ot mosással teljes mértékben el kellett távolítani. Ehhez többféle oldószert teszteltem és a legalkalmasabbnak az acetonitril bizonyult ultrahangos rázatással kombinálva.

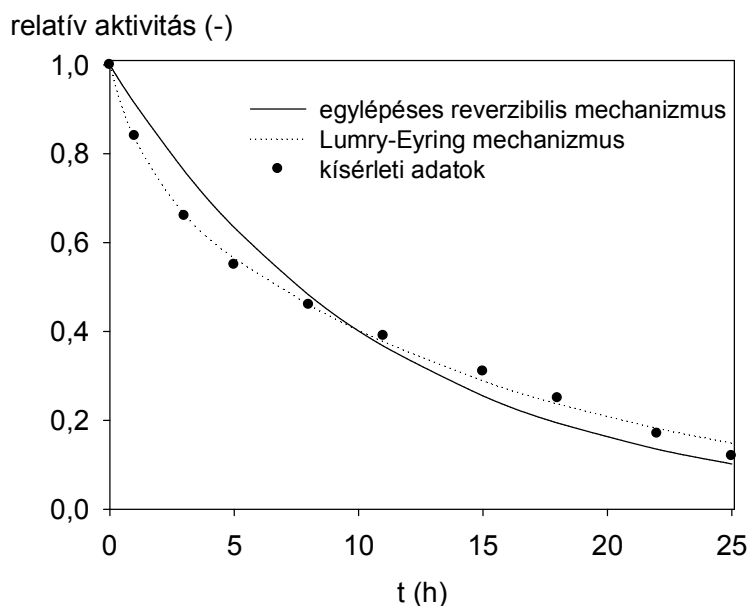
Az alkalmazott izotermikus adatelemzéssel csak egy általános leírás kapható az inaktivációs mechanizmusról. Például, hogy három lépésben játszódik le az inaktiváció, de az egyes lépések mibenlétéről nem ad felvilágosítást. A kísérleti adatok izotermikus kiértékelése során a 3.21. táblázatban feltüntetett két modellt használtam.

3.21. táblázat: Az izotermikus kiértékelésnél alkalmazott egy- és kétlépéses mechanizmusok adatai.

N : natív, D : denaturált, I : inaktív forma, b_I , d_I : a sebességi állandókból kifejezett állandók

név	mechanizmus	aktivitás-idő görbe matematikai leírása
egylépéses irreverzibilis	$N \xrightarrow{k_1} I$	$a = e^{-d} I^t$
Lumry-Eyring	$N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} D \xrightarrow{k_2} I$	$a = (1 - b_I) + b_I e^{-d} I^t$

A kétlépéses Lumry-Eyring mechanizmus alkalmazásával kapott modell a kísérleti adatokkal jobb egyezést mutatott, mint az egylépéses irreverzibilis modell mind ionos folyadékos közegre, mind oldószermentes rendszerre. A becsült aktivitás értékek standard hibája a Lumry-Eyring mechanizmusnál 2-4-szer alacsonyabb volt, mint az egylépésesnél. Ez azt jelenti, hogy a Novozym 435 ionos közegben és oldószermentes rendszerben bekövetkező inaktivációja legalább két lépésből áll. Egy példa az inaktivációs adatok és a modellekből kapott aktivitás értékek egyezésére 80 °C-on a 3.32. ábrán látható.



3.32. ábra: Az izotermikus mechanizmus modellekből kapott adatok összehasonlítása a kísérleti eredményekkel 80 °C-on.

A Lumry-Eyring mechanizmusú kiértékeléssel kapott modell paramétereit felhasználva meghatároztam a referencia hőmérsékletre (70 °C) az enzim felezési idejét ($t_{1/2}$) oldószermentes és ionos folyadékos közegben. A kettő hányadosa a termikus stabilizációs faktor (F):

$$F = \frac{t_{1/2 \text{ ionosfolyadék}}}{t_{1/2 \text{ oldószermentes}}} = 4.$$

Látható, hogy a [bmim]PF₆ ionos folyadék jelentősen stabilizálja a Novozym 435 enzimet, benne az enzim felezési ideje négyszer hosszabb, mint oldószermentes közegben. Ehhez hasonló stabilitási értékeket találtam *Candida rugosa* enzim esetén is [omim]PF₆ ionos folyadéknál, ahol az 50 °C-on mért felezési idők hányadosa 2.50 és 5.62 között változott a vízakaktivitás függvényében [23].

Méréseim, számításaim során kimutattam, hogy az ionos folyadék alkalmazásával az enzim élettartalma jelentősen megnőtt. Ez azért is fontos, mert az izoamil-acetát természetes aromaként való előállításához mindenképp az erős inhibícióval rendelkező ecetsavat kell felhasználni szubsztrátként. Megállapítottam tehát, hogy az ionos folyadék alkalmazása előnyt jelent enzimstabilitási szempontból természetes izoamil-acetát aroma-komponens biokonverziója során, miközben a hozam és a kezdeti reakciósebesség az oldószermentes közegben elértekkel közel megegyező volt. Ennek oka, hogy a [bmim]PF₆ ionos folyadék igen rendezett háromdimenziós szerkezettel rendelkezik (F-3, F-4. ábra). Ez a H-hidak által létrehozott erős struktúra körülzárja az enzimet és a körülötte lévő monomolekuláris rétegnyi vizet (F-5. ábra). Így egy kompakt és aktív enzimszerkezet jön létre az ionos folyadékon belül, ami erősen védett a hő- és egyéb hatásokkal szemben [Lozano, 2005; de Diego, 2005; Fehér, 2007].

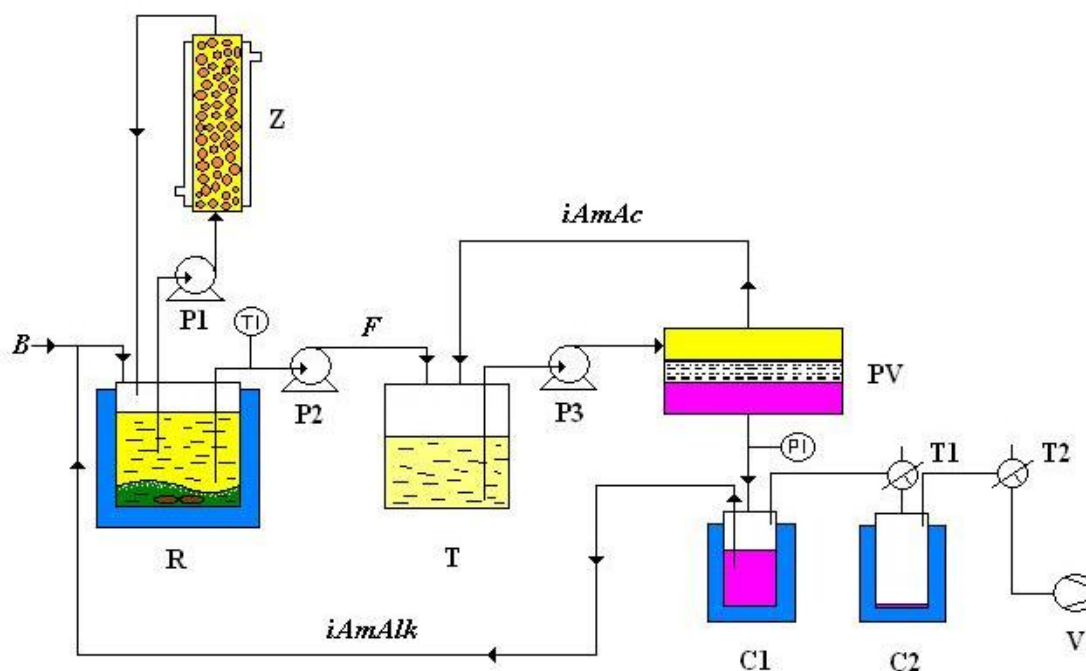
Mivel az általam használt immobilizált enzim az alkoholos és ionos folyadékos fázis határfelületén található, de az ionos folyadék stabilizáló hatása így is mérhető, ebből következően ez a stabilizáló folyamat dinamikus és reverzibilis kell hogy legyen, ami heterogén fázisban is fennáll. Mivel ez eddigi szerkezetvizsgálati mérések homogén fázisban történtek [Lozano, 2005; de Diego, 2005], ez új megállapításnak számít.

3.2.2.5. Az izoamil-acetát kinyerése a reakcióelegyből [82]

Az eddigiekben ismertettem a megfelelő reakcióközeg kiválasztásának útját az izoamil-acetát CALB enzim által katalizált előállítására. A reakció lejátszódása után azonban a terméket valamilyen módon ki is kell nyerni a képződött reakcióelegyből. Általában az oldószer eltávolítást bepárlással, desztillációval vagy extrakcióval oldják meg. Mindemellett figyelmet kell fordítani a felhasznált anyagok tisztítás utáni újrahasznosítására, csökkentve ezáltal az eljárás költségeit és a környezeti terhelést [Romero, 2005a].

Az eddig alkalmazott heteroazeotróp desztilláció és pervaporáció mellett számos egyéb módszer ismert még a víz eltávolítására. Ezek közül a zeolitos adszorpciót választottam a víztartalom csökkentésére, mert egyrészt az elválasztási vizsgálatokban az azeotróp elegy bontásának vizsgálatára fókuszáltam, másrészt ez a legegyszerűbb módszer. Az eljárás során

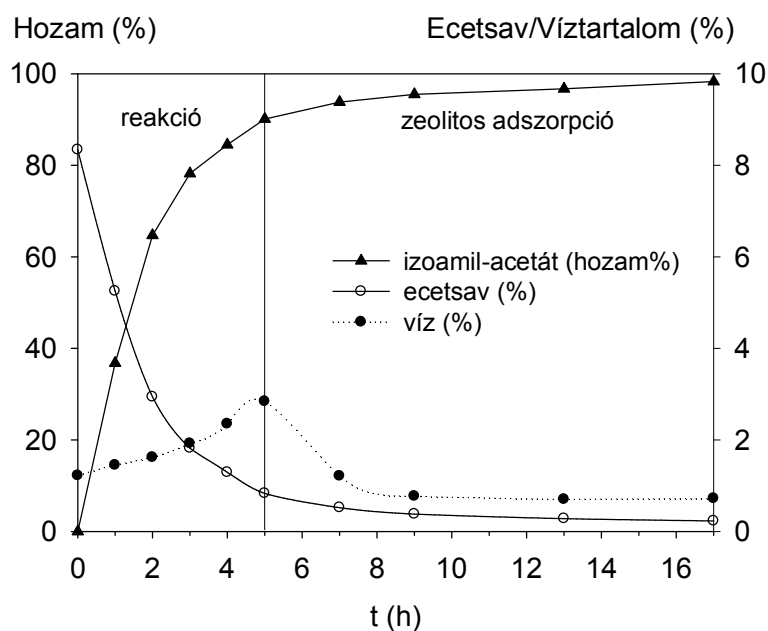
(3.33. ábra) 5 h reakcióidő után a reakcióelegyet zeolittal töltött üveg oszlopon (Z) keringtettem 12 h keresztül, miközben folyamatos mintavétellel ellenőriztem a sav-, acetát- és víztartalmat (3.34. ábra). A biokonverzió során az izoamil-acetát folyamatosan képződött a reaktorban (R) kb. 90%-os hozamig, az ecetsav mennyisége ennek megfelelően csökkent, a víztartalom enyhén emelkedett. A feldolgozás első lépésének tekinthető zeolitos adszorpció alatt a víztartalom exponenciálisan csökkent (2,8%-ról 0,7%-ra a felső fázisban), az ecetsav



3.33. ábra: Eljárás izoamil-acetát előállítására és szeparálására.

R: bioreaktor; Z: zeolitos adszorber; T: tartály; PV: pervaporációs modul; C1: hűtött csapda; C2: hűtött biztonsági csapda; P(1,2,3): perisztaltikus pumpa; T(1,2): T-csap; V: vákuum pumpa; TI: hőmérséklet mérő; PI: nyomás mérő; B: betáplálás; F: felső fázis; *iAmAc*: izoamil-acetátban dús reakcióelegy; *iAmAlk*: izoamil-alkohol. A T2 csap biztosítja a nyomás felengedését, a T1 csapnál újabb pervaporációs egység csatlakoztatására van lehetőség.

tartalom a 12 h alatt közel nulla lett (0,2% a felső fázisban), minek köszönhetően az egyensúly a felső nyíl irányába tolódott el és az izoamil-acetát hozam 98,3%-ot ért el. Az így kapott etil-acetát – izoamil-alkohol azeotróp szétválasztására keresni kellett egy megfelelő membránt, amely a fenti azeotróp elegyek egyik komponensét képes szelektíven elválasztani. A vizsgált membránok közül a Sulzer Pervap 2256 bizonyult képesnek az azeotróp elegy megbontására, az izoamil-acetátot teljes mértékben visszatartotta ($R=100\%$), míg az izoamil-alkohol retenciója 0 lett, tehát veszteség nélkül áthalad a permszelektív gáton [31].



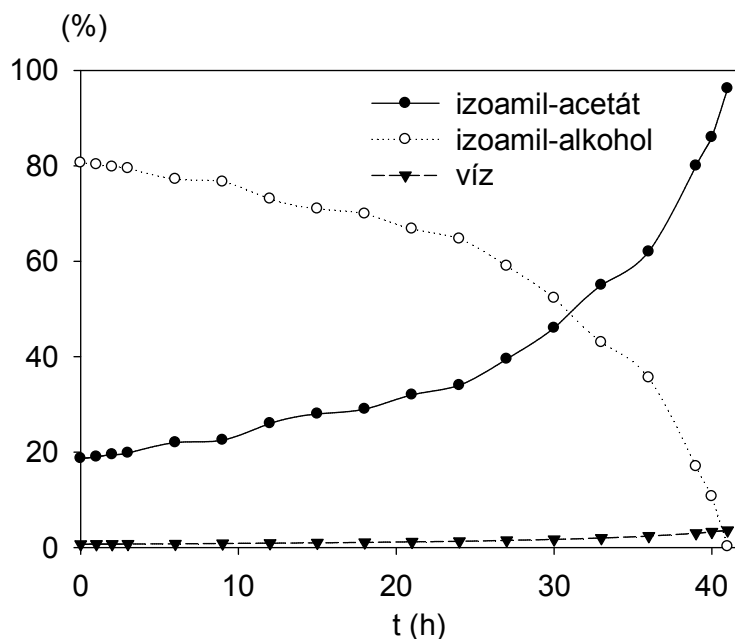
3.34. ábra: Az izoamil-acetát, ecetsav és víztartalom változása a reakció és zeolitos adszorpció során.

(A %-os értékek a felső fázisra értendők.)

A zeolitos adszorpcióban sav- és víztelenített oldat felső fázisát egy tartályba (T) szivattyúztam, majd hagytam szobahőfokra lehűlni. A kétfázisú rendszer alkalmazása előnyt jelentett ekkor, mert nem kellett az enzimet kiszűrni az oldatból, mivel az az alsó ionos folyadékos fázisban maradt (3.33. ábra). Így a feldolgozásra kerülő felső fázis csak alkoholt, acetátot és kis mennyiségű vizet tartalmazott. Ezután az elegyet a Pervap 2256 síklap membránt tartalmazó pervaporációs modulra (PV) vezettem. A permeátum oldalon a létrehozott nyomáskülönbség miatt gőzállapotú izoamil-alkohol (*iAmAlk*) távozott, amit acetonos száraz jéggel $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött csapdában (C1) kondenzáltam le. Ezután egy második, biztonsági okból elhelyezett szárazjeges, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os csapda (C2) következett a vákuum szivattyú (V) védelmének érdekében. A retentátként távozó, izoamil-acetátban folyamatosan dúsuló reakcióelegyet (*iAmAc*) a tartályba (T) vezettem vissza.

Folyamatosan ellenőriztem a kiindulási elegy összetételének változását a pervaporáció során (3.35. ábra). Mintegy 42 h üzemelési idő alatt sikerült az izoamil-alkohol/izoamil-acetát/víz elegy elválasztása. A kiindulási 80,6% izoamil-alkoholt és 18,7% izoamil-acetátot tartalmazó oldatból az alkohol eltávolítása után 96,4%-os észtert kaptam. Ez a termék szennyezőként 3,6% vizet tartalmazott, mivel a kiindulási elegyben lévő 0,7%-nyi vizet a Sulzer Pervap 2256 membrán 100%-osan visszatartotta. Ez a kis mennyiségű víz zeolit vagy molekulaszűrő alkalmazásával 24 h alatt könnyen eltávolítható. A termék [bmim]PF₆

nyomokat nem tartalmazott, mivel az a gőznyomásának hiánya miatt nem hatol át a membránon.



3.35. ábra: Az izoamil-acetát, izoamil-alkohol és víztartalom változása a pervaporáció során.

Az eredményeket összefoglalva: Létrehoztam egy integrált, félfolyamatos működésű rendszert, ahol az első lépésben 5 h-ás biokonverzió során kb. 90%-os hozamú reakcióelegy képződött. Ezt a lépést egy 12 h-ás zeolitos adszorpció követte, amely művelettel előállított reakcióelegy felső fázisa került szeparálásra egy másik egységben. Eközben a reaktorban maradó alsó fázissal új reakció indult, ami szintén összesen 17 h-ig tartott. A feldolgozás összesen 42 h órát vett igénybe, mivel az alkalmazott membránmodul mérete adott volt (12 cm²). Egy mintegy 30 cm² aktív felületű membránnal ezt az időt 17 h óra alá lehet csökkenteni, ami megegyezik a közel 100%-os biokonverzió eléréséhez szükséges idővel. Ekkor a rendszer félfolyamatosan üzemeltethető.

3.3. Biokenőanyag előállítása [22]

A szeszgyártás melléktermékeként keletkező kozmaolaj több, kisebb szénatomszámú alkohol mellett elsősorban izoamil-alkoholt tartalmaz. A természetes aroma észterek mellett a másik felhasználási területe biokenőanyag előállítása lehet. Ennek előállítását a kozmaolaj fő komponenséből, az izoamil-alkoholból és olajsavból kiindulva vizsgáltam enzimkatalizált észterezési reakcióban a következő egyenlet szerint:

olajsav + kozmaolaj frakció = olajsav észter + víz.

3.3.1. A reakciósebesség meghatározása [60]

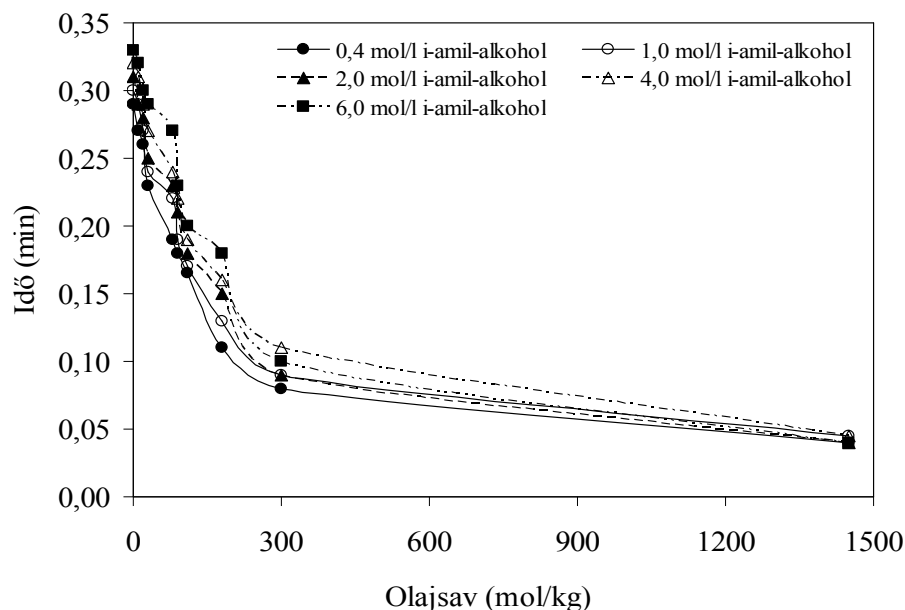
A vizsgálatokat rázó inkubátorban 30 °C-on, 200 rpm rázatási intenzitás mellett, 0.01 g Novozym 435 lipázt alkalmazva végeztem n-heptán oldószerben. Az izoamil-alkohol koncentrációját a 0.4 – 6.0, az olajsavét 0.2 – 2.0 mol/l koncentrációban változtattam, a kiindulási reakcióelegy víztartalma 0.1% volt. Célul tűztem ki, hogy az enzimes reakció lefutását minél többféle kiinduló paraméter mellett kimérjem. Kinetikai vizsgálatoknál a szubsztrát koncentrációt a valószínűsíthető K_M érték ötöde és ötszöröse között célszerű változtatni, ezt figyelembe véve, valamint az oldhatósági viszonyokat és a maximális koncentrációkat megvizsgálva készítettem a 3.22. táblázatban látható mérési tervet.

3.22. táblázat: A kísérletek mérési terve a bemérendő mennyiségekkel.

(felül izoamil-alkohol g-ban 25 ml -re kiszámolva, alul olajsav g-ban 25 ml re kiszámolva)

Alkohol mol/l Olajsav mol/l					
	0.4	1,0	2,0	4,0	6,0
0,2	0.88	2.20	4.40	8.81	13.22
	1.41	1.41	1.41	1.41	1.41
0,5	0.88	2.20	4.40	8.81	13.22
	3.53	3.53	3.53	3.53	3.53
1,0	0.88	2.20	4.40	8.81	13.22
	7.06	7.06	7.06	7.06	7.06
1,5	0.88	2.20	4.40	8.81	13.22
	10.59	10.59	10.59	10.59	10.59
2,0	0.88	2.20	4.40	8.81	13.22
	14.12	14.12	14.12	14.12	14.12

A 3.36. ábrán a 0,2 mol/l olajsav koncentrációjú reakciók időbeni lefutását mutatom be. Az egyes görbék a különböző kiinduló izoamil-alkohol koncentrációnál mért adatokat, az olajsav fogyását mutatják az idő függvényében. Az ábrán látható, hogy a kis mennyiségű olajsav a nagy alkohol feleslegben hamar elfogy és kialakul az egyensúlyi konverzió, mely tekintetében nincs különbség az alkoholfelesleg mértékében. Bár arra lehetne számítani, hogy a nagyobb alkoholfelesleg a termékképződés irányába tolja el a reakciót, de ez nem, illetve igen kismértékben következik be.



3.36. ábra: Az olajsav koncentráció változása a reakció az idő függvényében 0,2 mol/l kiindulási koncentrációnál.

Nagyobb kezdeti olajsav-koncentrációknál a kialakuló egyensúlyi konverzió már jelentősebb mértékben függ a kezdeti alkohol koncentráció értékétől, mint ahol az alkohol igen nagy feleslegben volt (itt a feleslegek rendre: 0,8-, 2-, 4-, 8- és 12-szeresek). Minél nagyobb az alkohol felesleg, annál nagyobb a kialakuló végleges, egyensúlyi konverzió. A reakció lefutásában már nem ennyire egyértelmű a trend, a középső értékeknél a legnagyobb a sebesség. Az itt látható különbségek is nagyobbak, mint a legkisebb 0,2 mol/l kiindulási olajsav koncentrációnál megfigyelhető értékek. A reakció ennél a mérési sorozatnál volt a leggyorsabb, már a hatodik óra után elérte az egyensúlyt, és az olajsav koncentrációja a továbbiakban nem változott. A magasabb kezdeti olajsav koncentráció esetén más jellegű lefutást tapasztalunk. A fő különbség, hogy az itt kialakuló egyensúlyi koncentrációk esetében a közepes koncentrációknál találjuk a legkisebb értékeket. A jelenséget magyarázhatja, hogy itt már igen magas termékkoncentrációk alakulnak ki, így ezek hatása az egyensúlyra igen jelentős.

Összefoglalva a mérési eredményeket megállapítható, hogy az egyes kiinduló olajsav koncentrációk esetén a kiinduló alkohol koncentráció növelésével változik a reakciók lefutása, és az elérhető egyensúly is. Úgy tűnik, hogy az olajsav és az izoamil-alkohol aránya és koncentrációja egyaránt befolyásolja az enzimes reakciót. Az adatok alapján végzendő részletes kinetikai elemzés tárja fel e viselkedés részleteit, hátterét.

A reakció időbeli lefutásából a kezdeti reakciósebességet a Gregory-Newton módszer alapján végeztem [Keleti, 1977]. A kezdeti reakciósebességi adatokat a felhasznált enzim mennyiségét figyelembe véve (1 g enzimre vonatkoztatva) módosítottam. A számításához felhasználtam, hogy minden kísérletnél meghatároztam a reakcióelegy tömegét, így az enzimkoncentrációt g/kg formában is ismertem. Tehát az irodalmi értékekkel is jól összehasonlítható adatokat a mol/kgs értékek g/kg-os enzimkoncentrációval való osztásával nyertem, kiküszöbölve a reakció folyamán változó sűrűség hatását is. A számított kezdeti reakciósebességi értékeket a 3.23. táblázat tartalmazza ($\mu\text{mol/s.g}_{\text{enzim}}$).

3.23. táblázat: A számított kezdeti reakciósebességek ($\mu\text{mol/s.g}_{\text{enzim}}$)

alkohol sav	0,40 mol/l	1,00 mol/l	2,00 mol/l	4,00 mol/l	6,00 mol/l
0,20 mol/l	4.9	5.13	5.45	5.57	3.5
0,50 mol/l	7.9	7.91	8.26	7.13	7.3
1,00 mol/l	9.68	12.56	12.8	9.69	10.8
1,50 mol/l	11.25	15.15	18.45	15.3	13.7
2,00 mol/l	9.78	14.46	17.65	14.5	14.3

3.3.2. Az enzim immobilizálás hatása az anyagátadásra

Mivel a reakcióban rögzített lipáz enzimet használtam, fontos megvizsgálni, hogy a kialakult reakciósebességek valóban az enzimes reakcióra jellemző értékek vagy a folyadékfázisból a szilárd rögzített fázishoz történő diffúzió sebességei. A reakció és a diffúzió két párhuzamosan fellépő jelenség, amelyik folyamat sebessége lassúbb, az lesz a sebességmeghatározó folyamat. Rögzített lipáz használatakor általában nem jellemző, hogy a folyadék-szilárd diffúzió sebessége lenne a meghatározó [Letisse, 2003]. Azt, hogy méréseimnél melyik lépés a sebesség-meghatározó, a Wiesz-Prater kritérium szerint Yadav módszerével [Yadav, 2002] vizsgáltam meg.

A módszer alapja két relaxációs idő kiszámítása és összehasonlítása. A biokatalízis sebességére jellemző relaxációs idő t_r és a diffúziót jellemző t_d aránya megmutatja, hogy az adott reakcióban az enzimkatalizált reakció vagy a diffúzió a meghatározó tényező.

Az egyes relaxációs paramétereket a következőképp definiáljuk:

$$t_r = \frac{C_0}{r(C_0)} \quad \text{és} \quad t_d = \frac{D}{(k_{SL})^2},$$

ahol az egyes paraméterek:

- C_0 : a folyadék fázisban mérhető szubsztrákoncentráció (mol/l)
- $r(C_0)$: a reakciósebesség (mol/ l s)
- D : a szubsztrát diffúziós tényezője a szerves fázisban (cm²/s)
- k_{SL} : a szilárd-folyadék anyagátadási tényező (cm/s)

A két szubsztrát közül a várhatóan lassabban diffundáló olajsav értékét vettem figyelembe, C_0 és $r(C_0)$ értékeit a 3.23. táblázat maximális értékeinek választottam:

$C_0=1,50$ mol/l (az a koncentráció ahol a legnagyobb reakciósebesség volt mérhető)

$r(C_0)=7.38 \cdot 10^{-6}$ mol/l s (a legnagyobb mért reakciósebesség [a kísérletekben a biokatalizátor koncentrációja 0,4 g/l-es volt így $r(C_0)=v_{max} \cdot C_{biokatalizátor}$])

$$t_r = \frac{C_0}{r(C_0)} = 2^5 \text{ s}$$

A szubsztrát (olajsav) diffúziós állandóját (D) n-heptánban Shibel nyomán határoztam meg [Perry, 1984]:

$$D = k \frac{T}{\eta_B V_S^{1/3}},$$

ahol:

- k : állandó $17.5 \cdot 10^{-8}$,
- η_B : az oldószer viszkozitása [n-heptán 60 °C-on 0.47 mPa (cP)],
- T : hőmérséklet [333 °K],
- V_S : moláris térfogatsűrűség.

A moláris térfogatsűrűséget a kritikus térfogat (V_c) alapján becsültem:

$$V_S = 0.285 V_C^{1,048}$$

Az olajsav kritikus térfogata 1152 cm³/mol, így a moláris térfogat sűrűség 460 cm³/g mol-nak adódott, így a diffúziós tényező értéke: $1.61 \cdot 10^{-5}$ cm²/s. A folyadék-szilárd anyagátadási tényező pedig a Sherwood szám alapján meghatározható, a diffúziós koefficiens és az enzimrögzítéshez felhasznált részecske mérete segítségével:

$$k_{SL} = 2D/d,$$

ahol d a részecske átmérője. A Novozym 435 enzimmészítmény átlagos átmérője 0,06 cm, az egyes részecskék átmérője a 0.03 és a 0.09 cm között változik. A folyadék-szilárd anyagátadási tényező így $5.3 \cdot 10^{-4}$ cm/s értékűnek adódott.

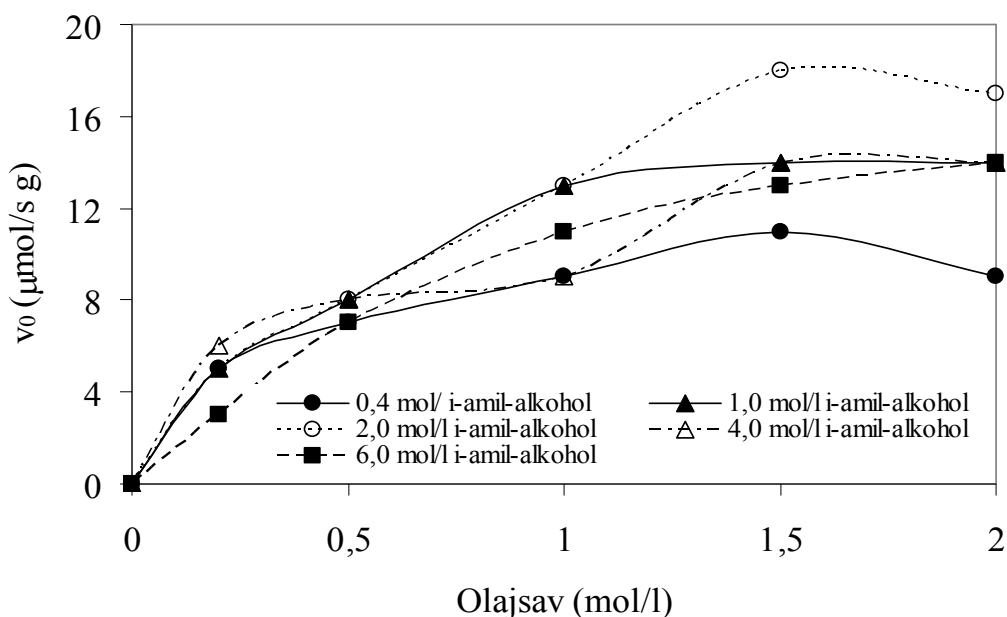
Tehát a diffúzióra jellemző relaxációs idő állandó értéke:

$$t_d = \frac{D}{(k_{SL})^2} = \frac{1,61 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}}{(5,3 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s})^2} = 55,9 \text{ s}.$$

Következésképp a folyamatban a diffúzió sebessége három nagyságrenddel nagyobb, mint az enzimkatalizált reakcióé. Így a későbbiekben meghatározott reakcióparaméterek nem látszólagosak, hanem valóban az enzimreakcióra jellemzőek.

3.3.3. Kinetikai analízis [57]

A 3.37. ábrán a kezdeti reakciósebességi állandók értékeit az olajsav koncentráció függvényében mutatom be, míg a 3.38. ábra ugyanezeket az adatokat az izoamil-alkohol koncentráció függvényében ábrázolja. Látható, hogy az olajsav koncentráció növelésével a kezdeti reakciósebesség a 0,5 mol/l olajsav koncentráció tartományig egyenletesen növekszik, ennél nagyobb koncentrációknál gátlási jelenséget tapasztaltam.

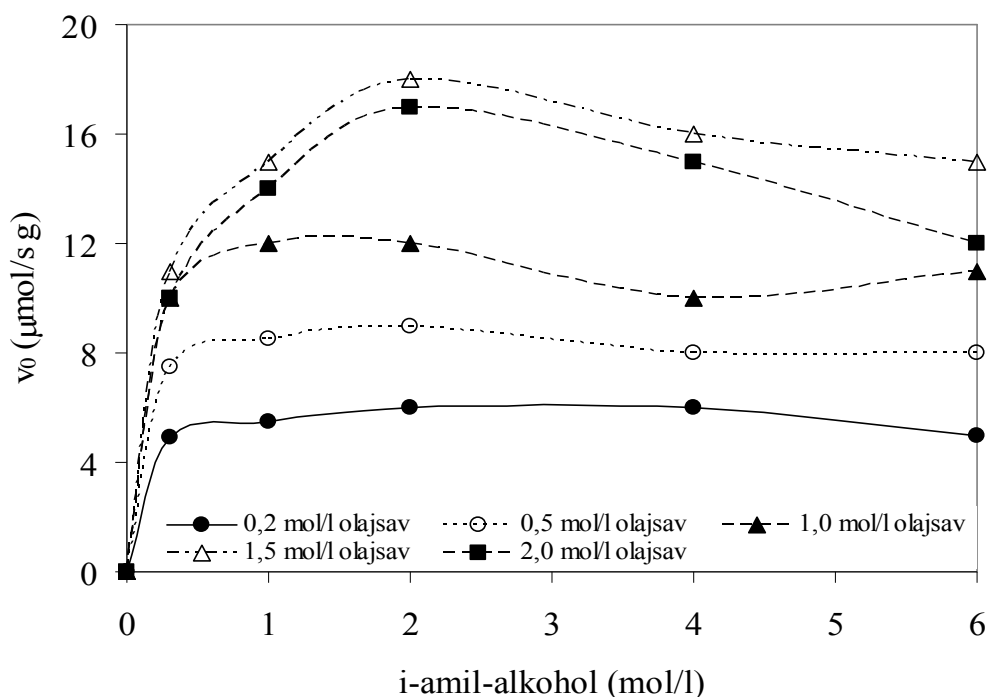


3.37. ábra: A kezdeti reakciósebességek a kiinduló olajsav-koncentráció függvényében.

A hatások mértéke eltérő az izoamil-alkohol koncentráció értékétől függően, a legnagyobb reakciósebességet az 1-2 mol/l izoamil-alkohol koncentrációnál tapasztaltam. A legalacsonyabb értékek a magas, 4-6 mol/l alkohol koncentrációnál láthatóak.

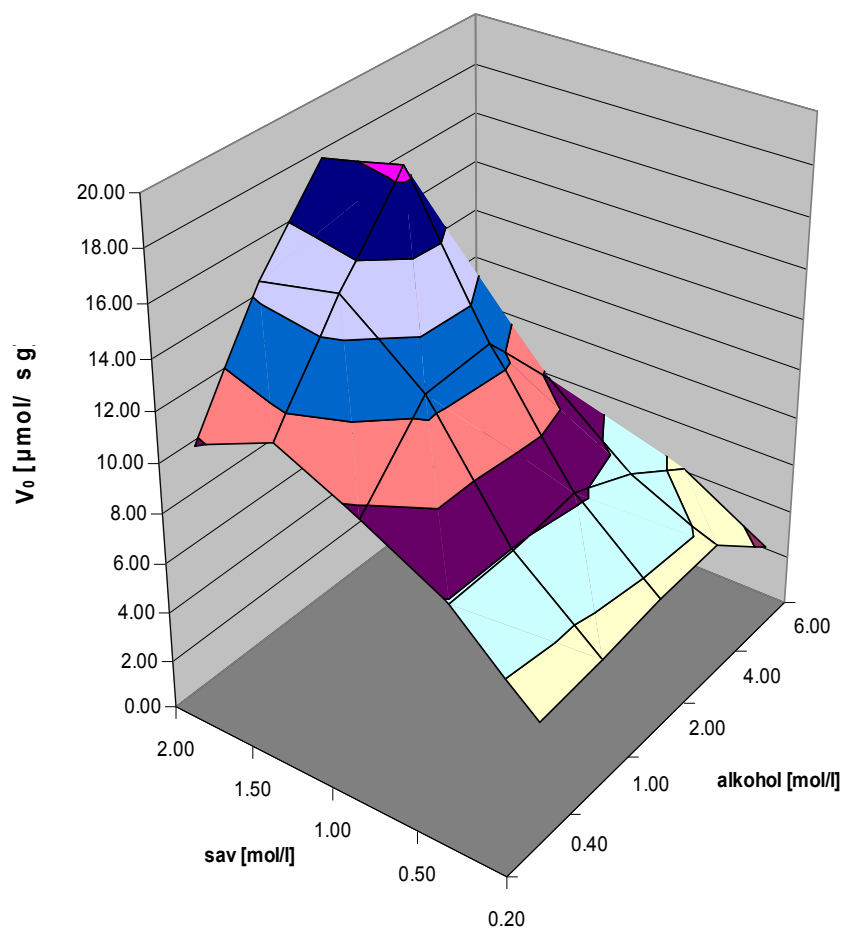
A 3.38. ábrán a kezdeti reakciósebességeket az izoamil-alkohol koncentráció függvényében ábrázoltam. Látható, hogy az itt kialakuló gátlások már sokkal jelentősebbek, mint az olajsav koncentráció függvényében látható sebességváltozások. Megfigyelhető, hogy a legnagyobb reakciósebességek itt a legmagasabb olajsav koncentrációknál alakultak ki. Az

izoamil-alkohol koncentrációját növelve 1-2 mol/l-ig a reakciósebesség növekszik, majd telítődik. Később és főleg nagyobb olajsav-koncentrációnál csökken, ez a csökkenés igen jelentős mértékű, akár végponti gátlásig is növekedhetne, ha 6 mol/l koncentrációnál töményebb oldatot vizsgálnánk. Ilyen koncentrációban azonban már nem tehetünk hozzá olajsavat a rendszerhez, mivel az szobahőmérsékleten meghaladná a tiszta olajsav koncentrációját.



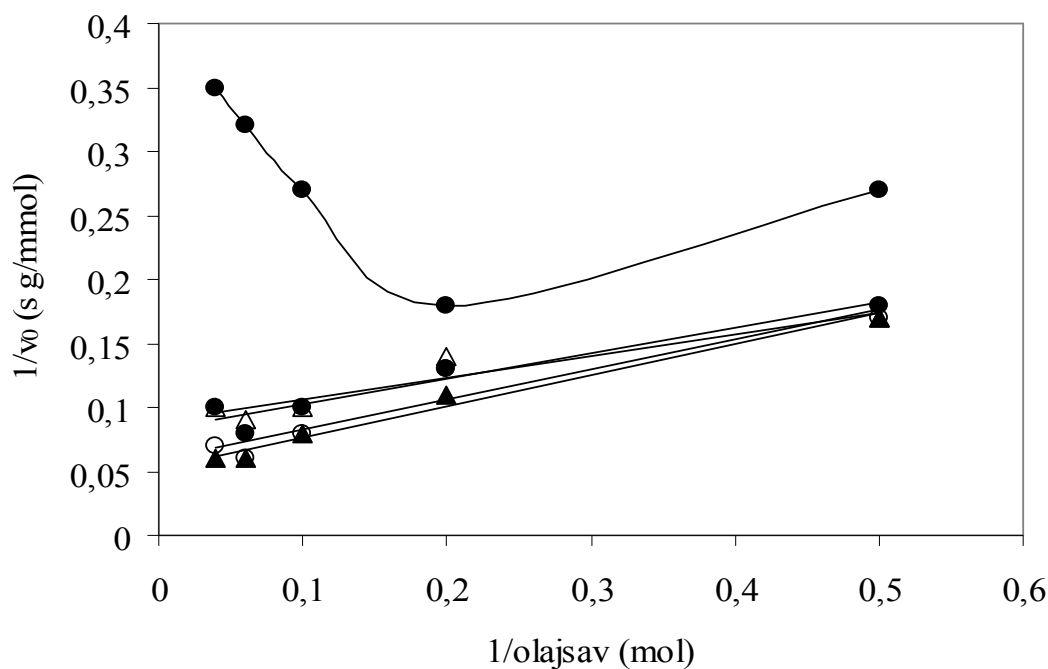
3.38. ábra: A kezdeti reakciósebességek az izoamil-alkohol koncentráció függvényében.

Az olajsav és az izoamil-alkohol koncentráció hatását a kezdeti reakciósebességre vizsgálhatjuk egy közös ábrán is. Így egy háromtengelyes koordináarendszerben vehetők fel az adatok. A két vízszintes tengelyen a szubsztrátkoncentrációkat, míg a függőleges tengelyen a kezdeti reakciósebességet ábrázoltam (3.39. ábra).



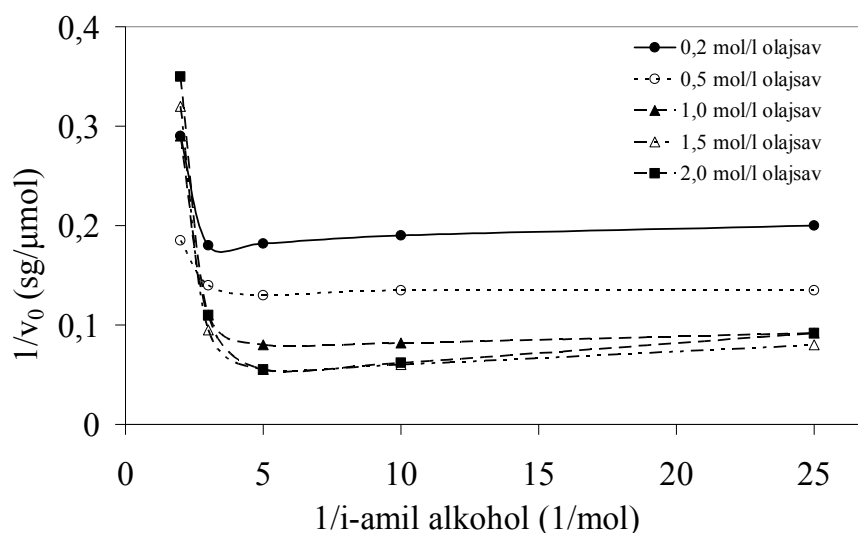
3.39. ábra: A kezdeti reakciósebességek az izoamil-alkohol és az olajsav koncentráció függvényében.

Az egyes hatások vizsgálatához a tradicionális linearizálási módszereket kell első lépésként alkalmazni. A 3.40. és a 3.41. ábrán a kezdeti reakciósebesség reciprokát az olajsav illetve az izoamil-alkohol koncentráció reciprokának függvényében ábrázoltam.



3.40. ábra: A kezdeti reakciósebesség reciproka az olajsav koncentráció reciprokának függvényében.

Látható, hogy kisebb izoamil-alkohol koncentrációknál közel lineáris az összefüggés, míg magasabb koncentrációknál az aszimptotához simuló logaritmikus alakú a görbe. Megállapítható, hogy a görbék az y tengely elérése előtt metszik egymást vagy párhuzamosak, így a reakció kinetikai paraméterek ily módon nem becsülhetők, ezért azok megállapításához a modellalkotás után analitikai módszert kell alkalmazni. A reakció



3.41. ábra: A kezdeti reakciósebesség reciproka az izoamil-alkohol koncentráció reciprokának függvényében.

mechanizmusára, az egyenesek párhuzamosságából a ping-pong bi-bi modellre lehet következtetni, amit az izoamil-alkohol koncentráció reciprokának függvényében ábrázolt olajsav fogyási sebességek szerint elkészített 3.41. ábra megerősít.

Megállapítható, hogy a nagy izoamil-alkohol koncentrációknál egyértelműen gátlás lép fel. Mivel az olajsav is gyenge gátlást fejt ki, ezért grafikus módon az egyes paraméterek nem határozhatóak meg, és a gátlás mechanizmusa sem tisztázható egyértelműen. Az irodalom szerint a bi-bi ping-pong mechanizmus leírására több modell is alkalmas [Fromm, 1975], ezek közül a három- (E-3.1.), a négy- (E-3.2) és az ötparaméteres (E-3.2) modellek sebességi állandóit határoztam meg.

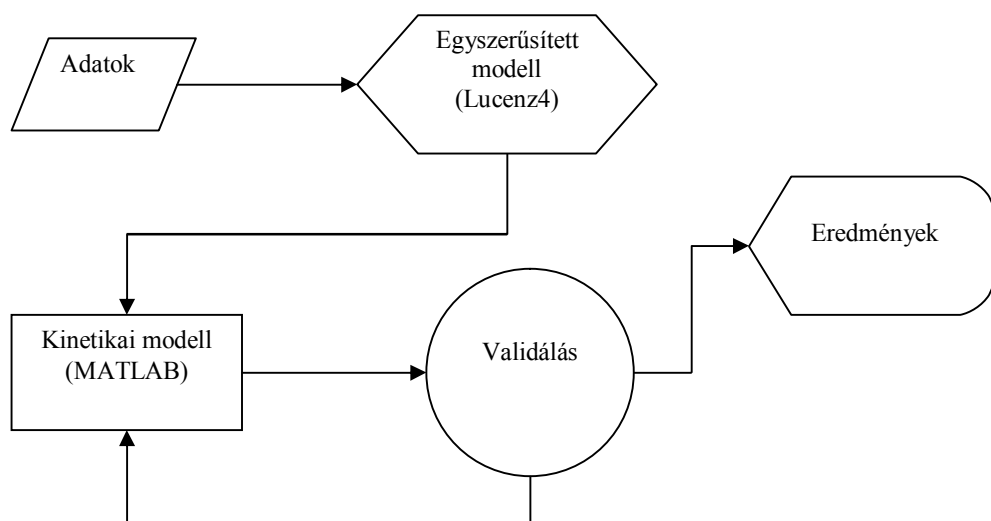
$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}} \quad \text{E-3.1.}$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_A}{[A]} \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}} \right) + \frac{K_B}{[B]}} \quad \text{E-3.2.}$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \left(\frac{K_A}{[A]} + \frac{K_{AB}}{[A]*[B]} \right) \left(1 + \frac{[B]}{K_{IB}} \right) + \frac{K_{BP}}{[B]}} \quad \text{E-3.3.}$$

A kinetikai paraméterek meghatározására a simplex módszer egyik változatát használtam, mely a MATLAB™ programba van beépítve. Ez a Neilder-Niemand módszer nem olyan robusztus és gyors, mint az eredeti simplex módszer és a paraméterek kezdeti értékeire is kényesebb, de sokkal pontosabb annál. Mivel a módszer érzékeny a paraméterek kiindulási értékeire, ezért ezeket külön egy erre a célra szolgáló programmal becsültem. Így a módszer egyik hátrányát, az instabilitást kikerültem. A rendszer elvi sémáját a 3.42. ábrán mutatom be.

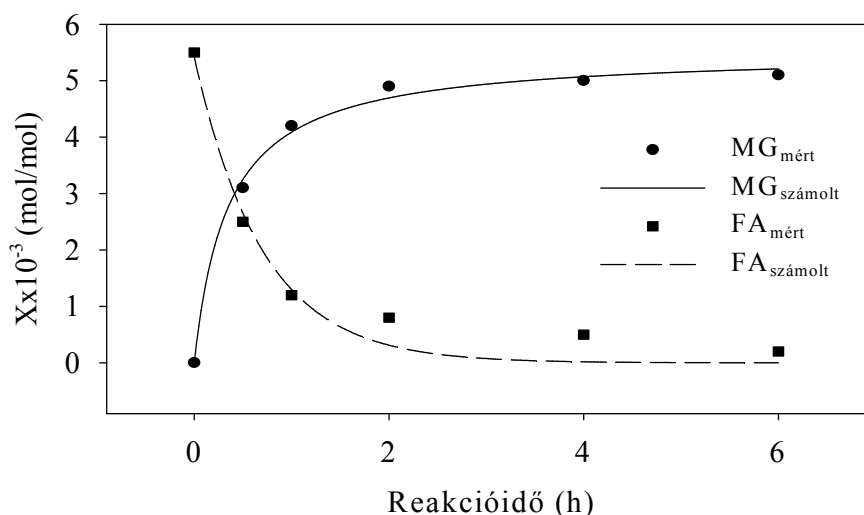
A modell eredményeket (3.24. táblázat) összehasonlítva a mért adatokkal, igen jó egyezést tapasztaltam, a maradék hiba a legkisebb négyzetek (RMS) szerint becsülve mindösszesen 3, ami sokkal pontosabb egyezés, mint eddig az irodalomban megállapított eredmények [Garcia, 1999]. A pontosabb eredményeket részben az eltérő analitikai megoldás, részben a kétlépcsős paraméter-meghatározás eredményezheti. Megállapítható, hogy az ötparaméteres modell nem szignifikánsan (F-statisztika, $p=0.059$) jobb, mint a négyparaméteres. A háromparaméteres modell azonban szignifikánsan rosszabb mindkettőnél. A négyparaméteres modellel nyert eredményeket és a kísérleti adatokat a 3.43. ábrán hasonlítom össze.



3.42. ábra: A kétlépcsős paraméter meghatározás sémája.

3.24. táblázat: A kinetikai modellek paramétereit.

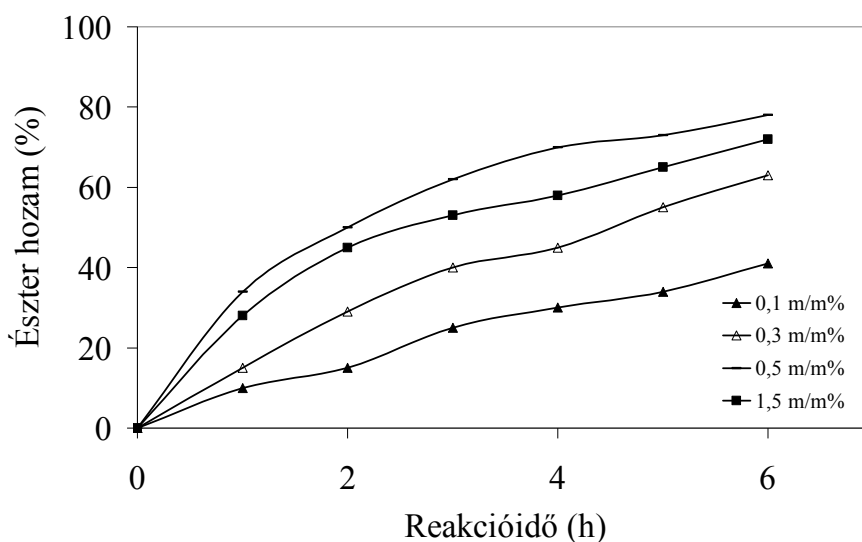
PARAMÉTEREK	HÁROM - PARAMÉTERES MODELL	NÉGY- PARAMÉTERES MODELL	ÖT- PARAMÉTERES MODELL
V_m ($\mu\text{mol/s g}$)	23.5	30.8	29.9
K_A (mol/L)	0.86	0.65	0.55
K_B (mol/L)	0.19	3.20	2.70
K_{iB} (mol/L)	-	0.58	0.53
K_{AB} (mol/L)	-	-	0.055
r^2 (-)	0.952	0.975	0.975
ARE(%)	12.2	3.1	2.8



3.43 ábra: A négyparaméteres modellel nyert eredmények és a kísérleti adatok összehasonlítása.

3.3.4. A biokenőanyag előállítás optimális paramétereinek meghatározása [16, 42,50,52]

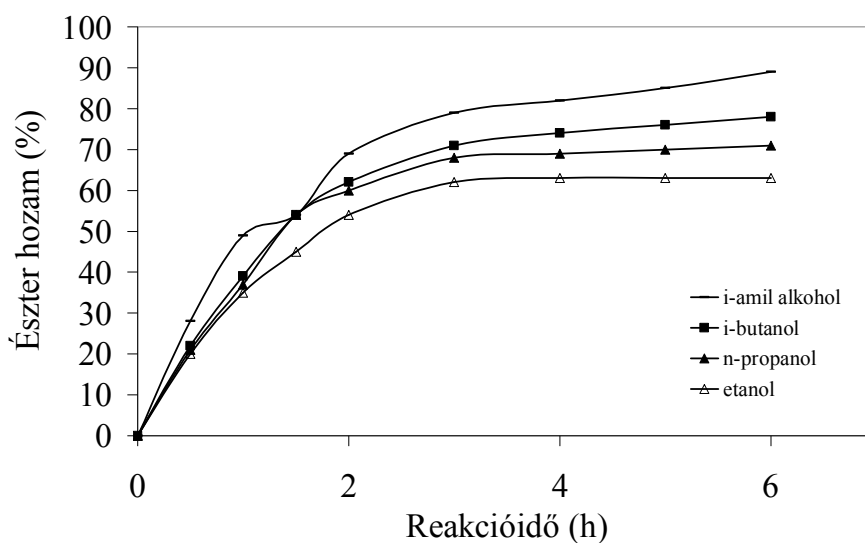
A reakció kinetikai vizsgálata után a reakció optimális paramétereit külön, részletesen is tanulmányoztam. Az aroma észterek előállításához hasonlóan a legfontosabb, a reakció hozamát befolyásoló paraméter a reakcióelegy víztartalma, amit a 0.1 – 1.5% tartományban vizsgáltam. A 3.44. ábrán látható, hogy ebben az esetben is maximumot mutat az észter hozam a kiindulási víztartalom függvényében. Nagyon alacsony víztartalom (0.1%) mellett az észter hozam csekély, a jelenlevő víz mennyisége nem elegendő az enzim optimális működéséhez. A kiindulási víztartalom növelésével az elért észter hozam nőtt, 0.5%-nál maximumot ért el, majd a további növelés hatására csökkenő tendenciát mutatott, ami az



3.44. ábra: Az észterhozam változása a reakcióidő függvényében különböző kiindulási vízkoncentrációknál.

ellentétes irányú reakció, a hidrolízis előtérbe helyeződésével magyarázható. Ezen mérések eredményeire támaszkodva a további kísérletekhez 0.5% kiindulási víztartalmat választottam. A további vizsgálatok alapján a Novozym 435 lipáz esetében megszokott magas, 60 °C-os hőmérséklet és az 1:2-as sav: alkohol mólarány bizonyult optimálisnak [14].

Külön vizsgáltam a kozmaolaj egyes komponenseinek reaktivitását. Azt tapasztaltam (3.45. ábra), hogy ez az alkohol szénatomszámának növekedésével növekedett az etanol, n-propanol, izobutanol, izoamil-alkohol sorrendben. Mivel a kozmaolaj összetételében a magasabb szénatomszámú alkoholok vannak túlsúlyban, magas konverzió elérésében bízhattunk.



3.45. ábra: Az észterhozam változása a reakcióidő függvényében a kozmaolaj különböző komponenseinél.

A kozmaolajjal végzett rázatott lombikos kísérletek során (1:2 sav/alkohol, 0.5 % enzim, 60 °C) a 6 óra elteltével beállt az egyensúly: 92 % olajsav észter hozamot értünk el. A reakció során nagy feleslegben képződött víz gátolja az enzim működését, megakadályozva ezzel a szubsztrát további átalakítását. Ahhoz, hogy a rendszert kimozdítsuk egyensúlyából az észterképződés felé, egy olyan szeparációs berendezésre van szükség, amit egy reaktoral összekacsolva, a képződő felesleges vizet folyamatosan eltávolítja és ezzel az összes szubsztrát elreagál. Erre a célra szolgált a 2.2. ábrán bemutatott berendezés, ahol a reaktor és a pervaporációs berendezés integrálásával sikeresen távolítottam el a reakcióban képződő vizet.

3.3.5. A biokenőanyag tribológia tulajdonságai

A kozmaolajból és olajsavból előállított biokenőanyag tribológiai tulajdonságait az ASTM szabvány szerint értékeltem (3.24. táblázat). A termikus és oxidációs vizsgálatok

eredményeit a 3.25. táblázatban foglaltam össze. Az eredmények összehasonlítása céljából megadtam egy kereskedelmi forgalomban kapható, szintetikus, DB-32 jelű dikarboxilsavészter típusú kenőanyag értékeit is. Amint látható, az előállított biokenőanyag alacsony lobbanáspontú termék. Kis folyáspontja miatt alacsony hőmérsékleten is alkalmazható. Viskozitásindexe meglehetősen magas, vagyis az észter viszkozitását a hőmérséklet csak kevésbé befolyásolja. Az olajsav nagyfokú konverziójára utal az alacsony savszám, míg a jód/bróm-szám a nagy telítettségre utal, ami az olaj gyenge pontja. A 3.25. táblázat adataiból látható, hogy a termikus és oxidációs vizsgálatok szerint a biokenőanyag stabilitása nagyobb, mint a referencia olajé. Viskozitásindexe magasabb, savszáma kisebb, a színváltozás elfogadható. A fenti tulajdonságai alapján az általunk előállított biokenőanyag elsősorban a gépiparban fémmegmunkálási folyamatok során kerülhet felhasználásra.

3.24. táblázat: A biokenőanyag tulajdonságai összehasonlítva a referencia olajával.

TULAJDONSÁG		BIOKENŐANYAG	DB-32
Sűrűség, d_{20}^{40}	g/cm ³	0.864	0.924
ASTM szín	-	0	0
Lobbanáspont (Cleveland)	°C	211	204
Folyáspont	°C	-27	nincs adat
Viszkozitás 100 °C-on	mm ² /s	2.28	2.70
Viszkozitás 40 °C-on	mm ² /s	6.39	9.03
Viszkozitásindex	-	207	148
Savszám	mg KOH/g	0,01	0,1
Jód/bróm-szám	g J/100g	68.4	nincs adat

3.25. táblázat: A termikus és oxidatív kezelés hatása a vizsgált kenőanyagokra.

Termikus vizsgálatok (200 °C, 12 h)						Oxidációs vizsgálatok (200 °C, 12 h, 20 dm ³ /h levegőáram)				
Kenő- anyag	VK _{100°C} mm ² /s	VK _{40°C} mm ² /s	VI _E	Szín	Savszám mg _{KOH} /g	VK _{100°C} mm ² /s	VK _{40°C} mm ² /s	VI _E	Szín	Savszám mg _{KOH} /g
DB-32	2.75	9.45	140	7	5.5	5.79	29.47	143	8	50.8.
Biokenő- anyag	2.29	6.41	209	0	0.1	5.57	25.91	162	8	1.6

3.3.6. A biokenőanyag toxicitásának vizsgálata

Az előállított biokenőanyag felszíni vizekre gyakorolt hatását az „Acute Fish Toxicity Test” segítségével végeztük zebrahalakon (*Brachydanio rerio*). Az expozíciós idő 96 óra volt statikus rendszerben. A kísérletekben 2 db 20 l-es akváriumot használtunk, ahol a kontrol akváriumba nem tettünk biokenőanyagot, míg a másokban koncentrációja az OECD előírásai szerinti LC₅₀ értéknek megfelelő 100 mg/l volt. 7-7, a szennyezésekre rendkívül érzékeny zebrahalat helyeztünk az akváriumokba. Megfelelő analitikai módszerekkel gondoskodtunk a víz paramétereinek (kémiai összetétel, hőmérséklet, oxigén telítettség, pH) állandó értéken tartásáról. Az adott időközönként (3, 6, 26, 48, 72 és 96 óra) után végzett megfigyelések szerint egyetlen hal sem pusztult el. Ez azt jelenti, hogy az előállított biokenőanyag nem toxikus az élő vizekre nézve.

3.4. Glicerín-monosztearát előállítása enzimkatalitikus észterezéssel

3.4.1. Kinetikai vizsgálatok [25]

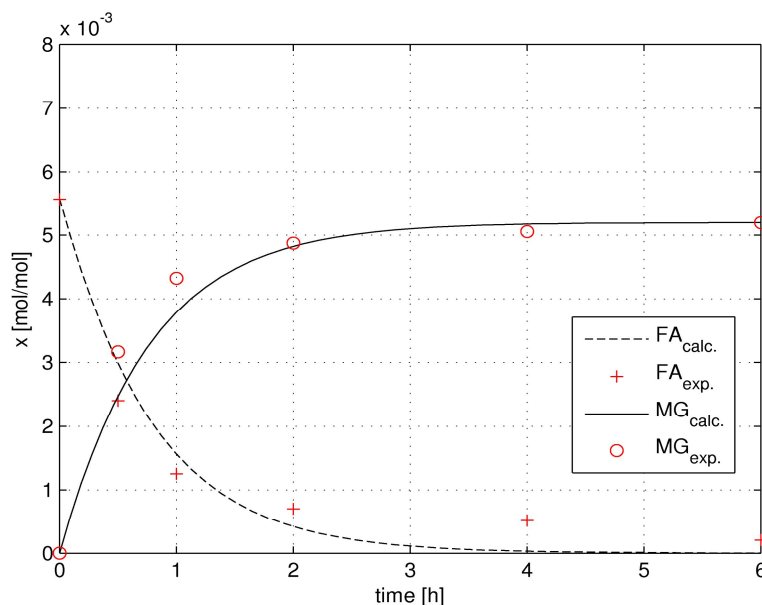
Vizsgálataim célja az oldószer mérnökség ismereteinek felhasználásával a glicerín-monosztearát (GM) szintézis optimális körülményeinek meghatározása volt a lehető legjobb monoglicerid hozam, szelektivitás, a katalitikus aktivitás és újrafelhasználhatóság szempontjából. A kiindulási anyagok, elsősorban a glicerín poláros anyagok, ezek oldásához a korábbiakban használtaktól eltérő oldószereket kellett alkalmazni. Az irodalmi adatok szerint az oldószer polaritása nagyban befolyásolja a reakció szelektivitását, melyet az általam elvégzett előkísérletek is igazoltak. Az enzim aktivitását tekintve legjobb oldószernek az acetón ($\log P = -0.23$) és a dioxán ($\log P = -1.3$) bizonyult. Mivel dioxánban az enzim szelektivitása is jó volt (90% feletti GM szelektivitás értékeket kaptam), a további méréseket ebben az oldószerben hajtottam végre.

A biokenőanyaghoz hasonlóan ebben az esetben is kinetikai vizsgálatokat végeztem. Megállapítottam, hogy ez a reakció is a ping-pong bi-bi mechanizmussal írható le legjobban. Az ismétlések elkerülése miatt a részleteket e helyen nem ismertetem, csak a modellel kapott és a mért adatok kiváló egyezését bemutató 3.45. ábrát mutatom be.

3.4.2. A glicerín-monosztearát előállítás optimális paramétereinek meghatározása [25, 54, 66, 67]

A rázatott lombikos kísérletek eredményei alapján a 10 mg/ml koncentráció volt optimális a reakció követhetősége és a reakciósebesség szempontjából egyaránt. A továbbiakban azt

vizsgáltam, hogyan lehetséges a paraméterek változtatásával még jobb szelektivitást, illetve magasabb észterhozamot elérni.



3.45. ábra: A modellel számított és a mért kísérleti adatok összehasonlítása glicerín-monosztearát szintézise során.

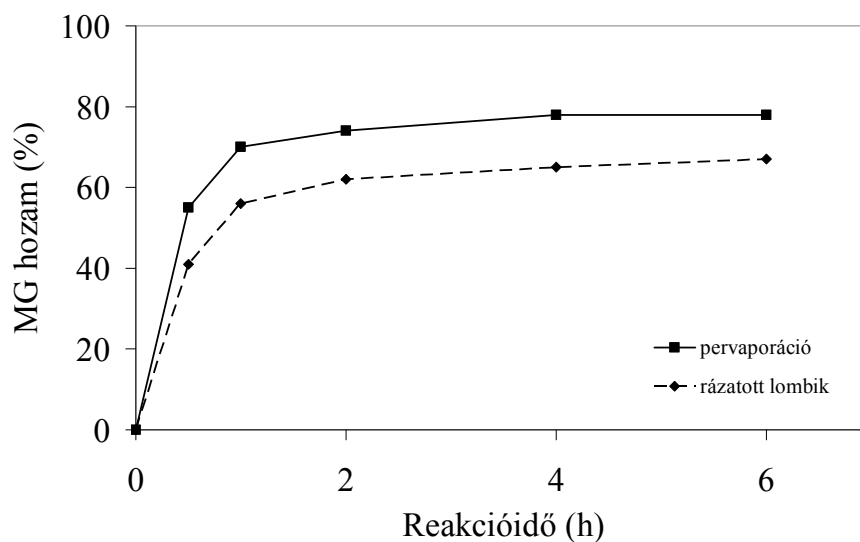
(FA-sztearinsav; MG-monosztearát; oldószer: dioxán)

Ahhoz, hogy megnöveljük a monoglicerid hozamot, pl. az egyensúly eltolásával, a keletkezett és a reakció szempontjából felesleges vizet el kellett távolítani. Ennek megvalósításához egy pervaporációs berendezést (2.2. ábra) állítottam össze, melynek segítségével a reakcióelegy víztartalmát közel állandó értéken tudtam tartani, valamint sikerült eltolni az egyensúlyt a kívánt észter képződésének irányába.

A pervaporációs kísérletek mellett párhuzamosan rázatott lombikos kísérleteket is végeztem, melyek eredményeit a 3.46. ábrán hasonlítottam össze. A grafikonon jól látható, hogy a keletkező víz elvételével sikerült az egyensúlyt a termék képződés irányába eltolni. Két óra reakció után rázatott lombikban 62.9%-os GM hozamot, míg pervaporációval több mint 10%-al magasabb, 74.2%-os GM hozamot értem el.

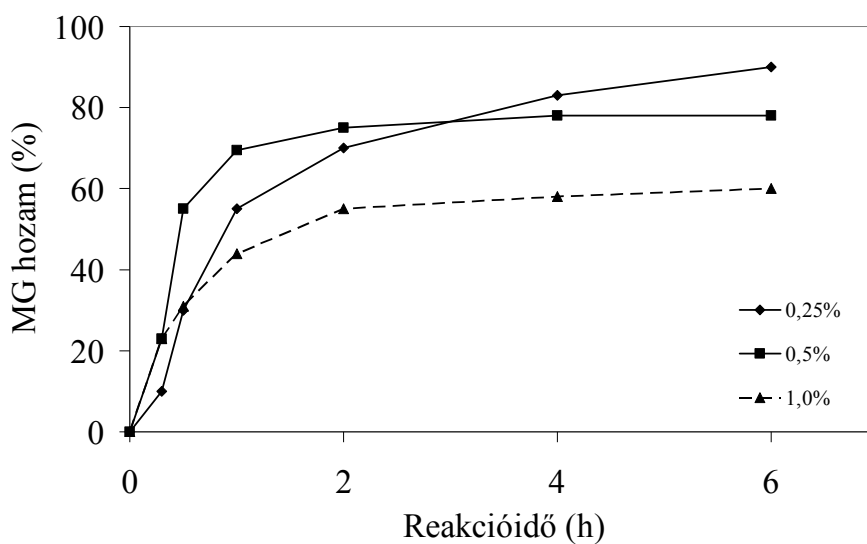
A 3.47. ábrán a pervaporációval végzett mérések eredményeit tüntettem fel 0.25, 0.5 és 1.0%-os víztartalom mellett. Az előzetes várakozásainknak megfelelően a reakcióelegy víztartalmának növelésével a kezdeti reakciósebességek is növekedtek, mivel nőtt az enzim hidratáltsága, ami kedvez a natív konformáció kialakulásának is. A víztartalom növelésével azonban az egyensúlyt kedvezőtlen irányban toltuk el, amit a monoglicerid hozam 1 h reakciódő utáni csökkenése jelzett. A 0.5 %-os víztartalom ígéretesnek tűnt a reakció szempontjából. Nagyon jó kezdeti reakciósebességet tudtunk elérni és jónak nevezhető monoglicerid hozamot kaptunk viszonylag rövid idő elteltével (4 óra alatt 76.8%). A 3.47.

ábra alapján azonban egyértelmű, hogy a legmagasabb, 90%-os monoglicerid hozamot 0.25%-os állandó víztartalom mellett érték el.



3.46. ábra: Állandó és változó víztartalom mellett végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása.

(víztartalom 0.5%, dioxán oldószer, 40 °C)



3.47. ábra: A GM hozam változása a víztartalom változtatásával.

(dioxán oldószer, pervaporációval).

3.26. táblázat: A termékösszetétel arány változása különböző kiindulási víztartalom mellett 6 óra reakció után.

PARAMÉTER	TERMÉKÖSSZETÉTEL (%)	
	glicerín-monosztearát	glicerín-disztearát
0.25 %-os víztartalom dioxán pervaporációval	94.6	5.4
0.5 %-os víztartalom dioxán pervaporációval	93.2	6.8
1 %-os víztartalom dioxán pervaporációval	94.4	5.6
0.5 %-os víztartalom dioxán rázatott lombikban	91.1	8.9

Szelektivitás szempontjából is megvizsgáltuk a reakciót. Az 3.26. táblázatból látható, hogy a víztartalom állandó szinten tartásával növelhető a reakció szelektivitása monoglicerid termékre nézve (0.5% állandó víztartalom esetében a szelektivitás több, mint 2%-al magasabb). Ugyanakkor az is megállapítható, hogy a víztartalom sokkal kisebb hatással van a szelektivitásra, mint az aktivitásra, értékét 0.25 és 1.0% között változtatva a változás alig haladja meg az 1%-ot.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az oldószermérnökség nem egy külön tudományága a kémiának, de mégis szerves része egy vegyészmérnök vagy vegyész életének. Azt a gyakorlati szempontból nagy jelentőségű folyamatot nevezzük így, amikor egy reakció kivitelezéséhez az adott körülményekhez igazodó, legalkalmasabb reakcióközeget keressük. Ekkor az általunk szabott kritériumoknak megfelelő reakcióközegekben alaposan megvizsgáljuk a kémiai reakciót és több szempontból történő összevetésük után kiválasztjuk a legjobbat. Az oldószermérnökség szerepe sokszorosan megnövekszik enzimkatalitikus reakciók esetében, mivel azok hagyományos oldószerét, a vizet ettől eltérő közegre cserélve drámai módon változhatnak meg az enzim tulajdonságai.

Értekezésemben a nem konvencionális közegekben lejátszódó enzimkatalitikus észterezéseket tanulmányoztam, folytatva az 1987-ben megkezdett és az addigi eredményeket összegző, 1995-ben megvédett kandidátusi értekezésemben ismertetett megállapításokat. A vonatkozó irodalom folyamatos nyomon követése mellett munkámat alapvetően két irányban folytattam. Az OTKA által támogatott alap kutatások szolgáltak az enzim-oldószer kapcsolatok alapvető összefüggéseinek feltárására, míg az ipari megbízások és meghatározó módon az egy UNDP projekt feladatai már a megszerzett ismeretek gyakorlati alkalmazását célozták meg. A legelsőként alkalmazott nem konvencionális közeg, a szerves oldószer mellett vizsgálatokat végeztem oldószermentes közegben, ionos folyadékokban és szuperkritikus szén-dioxidban. E két utóbbi közeg nemcsak környezetbarát tulajdonságaik miatt került az érdeklődés középpontjába: mindkettő az ún. méretre szabható (taylor made) oldószer közé tartozik. Az ionos folyadékok fizikai és kémiai tulajdonságai, például polaritásuk, hidrofóbicitásuk, viszkozitásuk, elegyedésük nagyon finoman szabályozható a felépítő kationok, anionok és szubsztituensek apró lépésekben történő változtatásával. Ílymódon a speciális kívánalmaknak megfelelően alakítható az enzimek aktivitása és szelektivitása. A szuperkritikus közegek, így a szén-dioxid esetében a hőmérséklet, a nyomás és a sűrűség optimális megválasztásával befolyásolhatók a reakcióparaméterek.

Dolgozatomban két lipázt vizsgáltam nem konvencionális körülmények között: a *Candida rugosa* a lipázok azon csoportjába tartozik, amelyek vízben zárt, inaktív, míg vizes-szerves határfelületen vagy szerves közegben egy fedél (lid) elmozdulásával nyitott, aktív konformációt vesznek fel. A *Candida antarctica* lipáz B (CALB) pedig a lipáz enzimek azon csoportjára példa, melyek a különböző oldószerekben nem szenvednek el ilyen jelentős

konformáció változást. Az előbbi enzimet szabad, míg az utóbbit immobilizált formában alkalmaztam.

Az alapkutatási jellegű OTKA megbízások során elsősorban az enzim – reakcióközeg – vízaktivitás kölcsönhatásokat vizsgáltam a *Candida rugosa* lipáz aktivitására, enantioszelektivitására és stabilitására. Megállapítottam, hogy a 2-szubsztituált propionsavak enantioszelektív észterezésekor állandó vízaktivitás biztosítható az $a_w=0.11 - 0.97$ tartományban különböző sók telített oldataival. Amennyiben a reakciót n-hexánban vagy annál polárosabb oldószerben vizsgáltam, 10%-os konverzióig elegendő volt a kiindulási vízaktivitást beállítani, mert eddig az értékig a vízaktivitás változás elhanyagolható. Mivel a sók reakcióba léphetnek az ionos folyadékokkal, ilyen esetben az optimális kezdeti vízaktivitást úgy értem el, hogy minden oldószer esetén meghatároztam a maximális kezdeti reakciósebességet biztosító kiindulási víztartalmat. Méréseim szerint a vizsgált reakcióban mind a *Candida rugosa* lipáz aktivitása, mindpedig enantioszelektivitása optimum görbe szerint változott a vízkoncentráció függvényében. A 2-es helyzetben különböző elektron donor illetve akceptor csoportokat tartalmazó propionsavak rezolválásakor kimutattam, hogy n-hexánban 0.08, [bmim]PF₆ ionos folyadékban 0.31 mol/dm³ vízkoncentrációt beállítva az elektronszívó klór- és bróm szubsztituensek közül a nagyobb méretű bróm szubsztituens esetében a reakciósebesség n-hexánban és [bmim]PF₆-ban is kisebb. Az elektrondonor szubsztituenseket tartalmazó királis propionsavak reakciósebessége általánosan alacsonyabb, és szintén megfigyelhető, hogy a konverzió a szubsztituens méretével mindkét oldószerben csökkent. Az elektronszívó klór szubsztituensre nagyobb méretű bróm szubsztituensre cserélve az E enantioszelektivitás n-hexánban 10-ről 18-ra, míg [bmim]PF₆ oldószerben 20-ról 29-re nőtt. Elektrondonor szubsztituensek esetén ezzel szemben a szubsztituens méretével csökkent az enantioszelektivitás.

Reakcióközeggként királis oldószereket, (+)- és (-)-karvont alkalmazva megállapítottam, hogy a konverzió (-)-karvonban lényegesen magasabb volt, mint (+)-karvonban, az enantioszelektivitás vizsgálatakor viszont nem tapasztaltam eltérést a két karvon izomerben mért érték között. Az aktivitásban jelentkező különbséget azzal magyaráztam, hogy az oldószer két optikai izomerje közül az egyik erősebben kapcsolódik az enzim kötő helyéhez, ezért a hozzáférhető szabad aktív centrumainak száma, így az enzim aktivitása csökkent.

Enzimkatalitikus észterezési reakcióban elsőként alkalmaztam a vízkoncentráció, s így a vízaktivitás állandó értéken tartására a heteroazeotróp desztillációt. Megállapítottam, hogy vízeltávolítás nélkül, amikor a reakcióban képződő víz növelte a reakcióelegy víztartalmát, a 3 h reakcióidő után mért észter hozam 0.2 – 0.3% kiindulási víztartalomnál mutatott

maximális értéket (28.4%), ezt követően fokozatosan csökkent. Ugyanezeket a vizsgálatokat állandó víztartalom mellett elvégezve a maximális észter hozamot 0.5%-nál kaptam (36.5%). Állandó víztartalom mellett az enantioszelektivitás a víztartalom növekedésével egyértelműen csökkent. A víztartalom csökkenésével az enzim szerkezete egyre merevebbé vált és a merev enzim egyre jobban különbséget tudott tenni az enantiomerek között.

A *Candida rugosa* lipáz dezaktiválódását vizsgálva kimutattam, hogy az a Henley-Sadana-féle soros dezaktivációs modellel írható le. Az enzim felezési idejét meghatározva megállapítottam, hogy az aktivitásához és szelektivitásához hasonlóan az enzim stabilitása is optimumgörbe szerint változott a vízakktivitás függvényében. A lipáz enzim visszaforgathatóságát tanulmányozva kimutattam, hogy a vizsgált ionos folyadékok mind aktivitás, mind szelektivitás szempontjából jobban megvédik az enzimet, mint a szerves oldószerek.

Az alapkutatási eredményeket három különböző területen, természetes aroma észterek, biokenőanyag és glicerín-monosztearát előállítása során hasznosítottam. 12 l névleges térfogatú laboratóriumi, majd 50 l névleges térfogatú nagylaboratóriumi méretű reaktorokban és a hozzájuk kapcsolódó feldolgozó berendezésekben valósítottam meg a természetes etil-acetát enzimkatalitikus előállítását CALB enzimmel úgy, hogy a szubsztrátgátlást okozó ecetsavat és etanolt fogyasztásuk ütemében adagoltam a reaktorba. A reakcióban nyert kb. 95 % etil-acetátot tartalmazó anyagot frakcionált desztillációnak vetettem alá. A végtermék gázkromatográfiás tisztasága 99,9 % felett volt, víztartalma 0,01 %, savszáma pedig 0,12 mg/g volt. Így a termék minősége mindenben meghaladta a standard minta paramétereit. Három reakcióban összesen 66,1 kg etil-acetátot állítottam elő, ez ecetsavra vonatkoztatva 86,8 % kitermelésnek felel meg. Az enzim a több mint 330 óra reakcióidő alatt nem veszített aktivitásából. Az alkalmazott reaktor kapacitása - ha csak az enzimkatalitikus reakciót végezzük a reaktorban – 1,5 t/év. Kísérleti eredményeim alapján a NITROIL Kft.-nél elkészült egy 20 t/év kapacitású természetes aroma gyártó üzem megvalósíthatósági tanulmánya, a technológiai kapcsolási terv és a szükséges épületek kialakítása. A munka befejezését a NITROIL Kft. privatizációja akadályozta meg.

Ugyancsak elsőként dolgoztam ki az etil-acetát előállítására olyan folyamatos eljárást, ahol homogén, ionos folyadékot tartalmazó reakcióközegben játszódott le a reakció és a szubsztrátok folyamatos betáplálása mellett a terméklevétel is folyamatosan történt: az etil-acetátot hidrofób, a vizet pedig hidrofil membránt tartalmazó pervaporációs egységben távolítottam el.

Hasonlóképp ionos folyadék oldószerben, de kétfázisú rendszerben tanulmányoztam az izoamil-acetát előállítását. Az ionos folyadékok felépítéséből származó előnyöket kihasználva 10 ionos folyadékot teszteltem és választottam ki a legalkalmasabbnak bizonyuló [bmim]PF₆-ot. Meghatároztam a reakció optimális paramétereit nemcsak ionos folyadékban, de oldószermentes közegben és szuperkritikus szén-dioxidban is. Az izoamil-acetát előállításakor a legjobb hozamokat és kezdeti reakciósebességet oldószermentes közegben és ionos folyadékban kaptam. Az optimális közeg megállapítására a Lumry-Eyring típusú kiértékeléssel enzimstabilitási vizsgálatokat végeztem, ami azt mutatta, hogy a CALB enzim stabilitása négyszer nagyobb ionos folyadékban, mint oldószermentes közegben. Az izoamil-acetát előállításánál rövid idő alatt (5 h) magas hozamot (~90%) és kezdeti reakciósebességet (~20 mmol_{acetát}/g_{enzim}×h) értem el, miközben az ionos folyadék valamint az enzim minimum 10-szer, tömegvesztés nélkül újrahasznosítható volt. Sikeresen alkalmaztam a pervaporációt az izoamil-alkohol/izoamil-acetát/víz azeotróp elegyből az izoamil-acetát kinyerésére. Ehhez először zeolitos adszorpcióval történő víztávolítással a reakció egyensúlyát eltoltam a kiindulási 90%-ról közel 100%-ra. Sulzer Pervap 2256 membránnal a terméket azeotróp elegyként tartalmazó felső alkoholos fázisból egy pervaporációs modulban szelektíven elválasztottam az izoamil-alkoholt. Így 42 h üzemelési idő után 96,4% tisztaságú izoamil-acetátot kaptam retentátumként, amely szennyezőként csak vizet tartalmazott.

Megállapítottam, hogy az olajsav izoamil-alkohollal történő észterezése CALB lipáz által katalizálva a ping-pong bi-bi mechanizmus szerint játszódott le. Az izoamil-alkohol jelentős, míg az olajsav enyhe szubsztrátgátlást okozott. A kinetikai paramétereket négyparaméteres modellben simplex módszerrel határoztam meg. Az enzimkinetikai modell segítségével meghatároztam azt az optimális kiinduló paraméter tartományt, amely a lehető legnagyobb hatékonyságú észter előállítást eredményezi. Az izoamil-alkoholt kozmaolajjal helyettesítve biokenőanyagot állítottam elő, melynek tulajdonságai jobbak, termikus és oxidatív stabilitása jobb, mint a kereskedelemben kapható szintetikus kenőanyagé, a toxicitási vizsgálatok szerint az élő vizekre veszélyt nem jelent.

A biodízel gyártás melléktermékeként keletkező glicerín és olajsav felhasználásával glicerín-monosztearátot állítottam elő erősen poláros oldószerben, dioxánban. A CALB aktivitását és szelektivitását a reakcióelegy víztartalmának változtatásával tudtam befolyásolni. 0.25% állandó víztartalom mellett 76.8 % hozammal, 94.6% tisztasággal tudtam a terméket előállítani. A kinetikai vizsgálatok szerint ez a reakció is ping-pong bi-bi mechanizmus szerint játszódott le.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- Allen, CAW.:** Properties of methyl esters of interesterified triacylglycerols, *Proc. 3rd Liquid Fuel Conf.*, Nashville, USA 73-82 (1996)
- Arlt, W.,** Seiler, M., Jork, C., Schneider, T.: Ionic liquids as selective additives for the separation of close-boiling or azeotropic mixtures, *World Pat*, WO 2002 074718 (2002)
- Armstrong, D. W.;** Yamazaki, H., *Tibtech*, **10** 264-268 (1986)
- Armstrong DW.,** He LF., Liu YS.: Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography, *Anal Chem*, **71** 3873-3876 (1999)
- Arroyo, M.,** Sánchez-Montero, JM., Sinisterra, JV.: Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, *Enzyme Microb Technol*, **24** 3-12 (1999)
- Barzana, E.,** Klivanov, A., Karel, M.: Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous-phase, *Biotechnol Bioeng*, **34** 1178-1185 (1989)
- Bell, G.,** Blain, JA., Patterson, JDE., et al.: Ester and glyceride synthesis by *rhizopus-arrhizus* mycelia, *FEMS Microbiol Lett*, **3** 223-225 (1978)
- Bellot, JC.,** Choisnard, L., Castillo, E., Marty, A.: Combining solvent engineering and thermodynamic modelling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification, *Enzyme Microb Technol*, **28** 362-369 (2001)
- Berger, M.,** Schneider, M.: Regioisomerically pure monoacylglycerol as synthetic building blocks, *Fat Sci Technol.*, **95** 169-175 (1993)
- Bodnár, J.,** Gubicza, L., Szabó, LP.: Enantiomeric separation of 2-chloropropionic acid by enzymatic esterification in organic solvents, *J Mol Catal B-Enzym*, **61** (3) 353-361 (1990)
- Bommarius, AS,** Riebel, BR.: Biocatalysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, (2004)
- Buchholz, K.,** Kasche, V., Bornscheuer, UT.: Biocatalysts and Enzyme Technology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, (2005)
- Cantone, S.,** Hanefeld, U., Basso, A.: Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase, *Green Chem*, **9** 954-971 (2007)
- Carrea, G.,** Riva, S.: Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, (2008)
- Catoni, E.,** Cernia, E., Palocci, C.: Different aspects of 'solvent engineering' in lipase biocatalysed esterifications, *J Mol Catal A Chemical*, **105** 79-86 (1996)
- Cernia, E.,** Palocci, C., Soro, S.: The role of the reaction medium in lipase-catalysed esterifications and transesterifications, *Chem Phys Lipid*, **93** 157-168 (1998)
- Chen, CS.,** Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, CJ.: Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers, *J Am Chem Soc*, **104** (25) 7294-7299 (1982)
- Chen, CS.,** Wu, SH., Girdaukas, G., Sih, CJ.: Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. 2, Enzyme-catalysed esterifications in water-organic solvent biphasic systems, *J Am Chem Soc*, **109** 2812-2817 (1986)
- Costantino, HR.,** Griebenow, K., Langer, R., Klivanov, AM.: On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups, *Biotechnol Bioeng*, **53** (3) 345-348 (1997)
- Cremlyn, RJW.:** Pesticides, preparation and mode of action, Wiley: Chichester, p.143. ISBN: 0471996319, (1978)
- Davison, BG.:** Chemical modification of biocatalysts, *Curr Op Biotech*, **14** 379-386 (2003)
- Davison, BH.,** Barton, JW., Petersen, GR.: Nomenclature and methodology for classification of nontraditional biocatalysis, *Biotech Progress*, **13** (5) 512-518 (1997)

de Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L.: Understanding structure - Stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Biomacromolecules*, **6** 1457-1464 (2005)

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R.: Lipase-catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity, *Enzyme Microb Tech*, **22** 212-216 (1998)

Dukai, J., Nagy, L., Söptei, Cs. Tömördi, E., Sebők, D., Ujhidy, A., Gubicza, L., Kovács, S., Kiss, L.: Eljárás O-szubsztituált hidroxiecetsavak és észterek előállítására. 197 873 lajstromszámú magyar szabadalom (1989).

Dupont, J.: On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids, *J Brazil Chem Soc*, **15** 341-350 (2004)

Eckstein, M., Wasserscheid, P., Kragl, U.: Enhanced enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas* sp. At high temperatures and fixed water activity in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide, *Biotechnol Lett*, **24** (10) 763-767 (2002)

Erable, B., Maugard, T., Goubet, I., Lamare, S., Legoy, M.D.: Biotransformation of halogenated compounds by lyophilized cells of *Rhodococcus erythropolis* in a continuous solid-gas biofilter, *Process Biochem*, **40** 45-51 (2005)

Erbeldinger, M., Mesiano, M.J., Russel, A.J.: Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents, *Biotechnol Prog*, **16** 1129-1131 (2000)

Faber, K.: Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, Heidelberg, (1992)

Fitzpatrick, P.A., Klivanov, A.M.: How can the solvent affect enzyme enantioselectivity?, *J Am Chem Soc*, **113** 3166-3171 (1991)

Flenker, J., Spener, F. Hydroxy-monoglycerides by lipases-catalyzed partial hydrolysis of castor oil, *DECHEMA Biotechnol. Conf.* **4 Pt. A** 139-142 (1990)

Fletcher, P.D.I., Freedman, R.B., Robinson, B.H., Rees, G.D., Schomäcker, R.: Lipase catalyzed ester synthesis in oil continuous microemulsions, *Biochim Biophys Acta*, **912** 278-282 (1987)

Fromm, H.J.: Initial Rate Enzyme Kinetics Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, New York (1975)

Gacesa, P., Hubble, J.: Enzymtechnologie, Springer-Verlag, Heidelberg, (1992)

Garcia T., Coteron, A., Martinez M., Aracil, J.: Kinetic Modelling of Esterification Reactions Catalysed by Immobilized Lipases, *Chem Eng Sci*, **51** 2841-2846 (1996)

Gentili, A., Curini, R., Cernia, E., D'Ascenzo, G.: Thermal stability and activity of *Candida cylindracea* lipase, *J Mol Catal B: Enzym*, **3** (1-4) 43-49 (1997)

Ghamgui, H., Karra-Chaabouni, M., Bezzine, S., Miled, N., Gargouri, Y.: Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system, *Enzyme Microb Tech*, **38** 788-794 (2006)

Goddard, R., Bosley, J., Al-Duri, B.: Esterification of oleic acid and ethanol in plug flow (packed bed) reactor under supercritical conditions: Investigation of kinetics, *J Supercrit Fluids*, **18** 121-130 (2000)

Gotor-Fernandez, V., Brieva, R., Gotor, V.: Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals, *J. Mol. Catal B:Enzym* **40** (3-4) 111-120 (2006)

Greenspan, L.: Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions, *J Res Nat Bur Stand-A. Phys Chem*, **81** (1) 89-96 (1977)

Gubicza L.: Effect of the solvent of enzyme enantioselectivity, *Prog Biotechn*, **8**, 497-504 (1992)

Gubicza, L., KelemenHorvath, I.: Effect of water-mimicking additives on the synthetic activity and enantioselectivity in organic-solvents of *candida-cylindracea* lipase, *J Mol Catal*, **84** (1) L27-L32 (1993)

Gubicza, L., Szakacschmidt, A.: Effects of the reaction conditions on the enantioselective esterification using *Candida cylindracea* lipase, *Biocatalysis*, **9** (1-4) 131-143 (1994)

Gulati, R., Arya, P., Malhotra, B., Prasad, AK., Saxena, RK., Kumar, J., Watterson, AC., Parmar, VS.: Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6) – monostearate, *Arkivoc*, 159-170 (2003)

Güvenc, A., Kapucu, N., Kapucu, H., Aydogan, Ö., Mehmetoglu, Ü.: Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology, *Enzyme Microb Tech*, **40** 778-785 (2007)

Güvenc, A., Kapucu, N., Mehmetoglu, Ü.: The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system, *Process Biochem*, **38** 379-386 (2002)

Hagiwara, R., Ito, Y.: Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions, *J Fluorine Chem*, **105** 221-227 (2000)

Halling, P.J.: Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media, *Biotechnol Tech*, **6** (3) 271-276 (1992)

Han, J.J., Rhee, J.S.: Effect of salt hydrate pairs for water activity control on lipase-catalysed synthesis of lysophospholipids in a solvent free system, *Enzyme Microb Tech*, **22** (3) 158-164 (1998)

Hayes, D.G., Gulari, E.: 1-monoglyceride production from lipase catalyzed esterification of glycerol and fatty acid in reverse micelles, *Biotechnol Bioeng*, **38** 507-517 (1991)

Hazarika, S., Goswami, P., Dutta, NN., Hazarika, AK.: Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents, *Chem Eng J*, **85** 61-68 (2002)

Henley, J.P., Sadana, A.: Series-type enzyme deactivations: influence of intermediate activity on deactivation kinetics, *Enzyme Microb Technol*, **6** 35-41 (1984)

Henley, J.P., Sadana, A.: Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism, *Enzyme Microb Technol*, **7** 50-60 (1985)

Hernández, F.J., de los Ríos, AP., Gómez, D., Rubio, M., Villora, G.: A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl Catal B- Environ*, **67** 121-126 (2006)

Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D.: Lipases and their industrial applications - An overview, *Appl Biochem Biotech*, **118** 155-170 (2004)

Illanes, Á.: Enzyme Biocatalysis, Springer Science + Business Media B.V., Heidelberg (2008)

Illeová, V., Polakovic, M., Stefuca, V., Acai, P., Juma, M.: Experimental modelling of thermal inactivation of urease, *J Biotechnol*, **105** (3) 235-243 (2003)

IoLiTech, http://www.iolitec.de/index_e.htm, 2008. augustus 25.

Izak, P., Mateus, N. M. M., Afonso, C. A. M., Crespo, J. G.: Enhanced esterification conversion in a room temperature ionic liquid by integrated water removal with pervaporation, *Sep Purif Technol*, **41** (2) 141-145 (2005)

Jager, G., Velvis, H.: Suppression of rhizoctonia-solani in potato fields.2. Effect of origin and degree of infection with rhizoctonia-solani of seed potatoes on subsequent infestation and on formation of sclerotia, *Neth J Plant Pathol*, **89** (4) 141-152 (1983)

Jain, N., Kumar, A., Chaunhan, S., Chaunhan, SMS.: Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *Tetrahedron*, **61** 1015-1060 (2005)

Janssen, AEM., Vaidva, AM., Halling, P.J.: Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media, *Enzyme Microb Tech*, **18** (5) 340-346 (1996)

Jastorff, B., Mölter, K., Behrend, P., Bottin-Weber, U., Filser, J., Heimers, A., Ondruschka, B., Ranke, J., Schaefer, M., Schröder, H., Stark, A., Stepnowski, P., Stock, F., Störmann, R., Stolte, S., Welz-Biermann, U., Ziegert, S., Thöming, J.: Progress in evaluation of risk potential of ionic liquids-basis for an eco-design of sustainable products, *Green Chem*, **7** 362-372 (2005)

Jastorff, B., Störmann, R., Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Oberheitmann, B., Hoffmann, W., Hoffmann, J., Nüchter, M., Ondruschka, B., Filser, J.: How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation, *Green Chem*, **5** 136-142 (2003)

Jensen, RG., Pitas, RE.: Milk lipoprotein lipases review, *J Dairy Sci*, **59** (7) 1203-1214 (1976)

Jessop, PG., Leitner, W.: Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1-30 és 425-428 (1999)

Jiang, T., Chang, Y., Zhao, G., Han, B., Yang, G.: Preparation of room-temperature ionic liquids by neutralization of 1,1,3,3-tetramethylguanidine with acids and their use as media for Mannich reaction, *Synthetic Commun*, **34** 225-230 (2004)

Jork, C., Kristen, C., Pieraccini, D., Strak, A., Chiappe, C., Beste, YA., Arlt, W.: Tailor-made ionic liquids, *J Chem Thermodyn*, **37** 537-558 (2005)

Kaar, JL., Jesionowski, AM., Berberich, JA., Moulton, R., Russell, AJ.: Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability, *J Am Chem Soc*, **125** (14) 3125-4131 (2003)

Kamat, S., Critchley, G., Beckman, EJ., Russell, A.J.: Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids. 3. Does carbon-dioxide covalently modify enzymes, *Biotechnol Bioeng*, **46** 610-620 (1995)

Karra-Chaabouni, M., Ghamgui, H., Bezzine, S., Rekik, A., Garggouri, Y.: Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system, *Proc Biochem*, **41** (7) 1692-1698 (2006)

Kazandjian, RZ., Klivanov, AM.: Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform, *J Am Chem Soc*, **107** (19) 5448-5450 (1985)

Keleti, T.: Enzimkinetika, Tankönyvkiadó, Budapest, (1978)

Khan, SA., Halling, PJ., Bell, G.: Measurement and control of water activity with an aluminium oxide sensor in organic 2-phase reaction mixtures for enzymatic catalysis, *Enzyme Microb Tecchnol*, **12** (6) 453-458 (1990)

Kiran, KR., Divakar, S.: Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media, *J Biotechnol*, **87** 109-121 (2001)

Kirchner, G., Scollar, MP., Klivanov, AM.: Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents, *J Am Chem Soc*, **107** 7072-7076 (1985)

Kirk, O., Christensen, M. W.: Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin, *Org Process Res Dev*, **6** (4) 446-451 (2002)

Kitaguchi, H., Itoh, I., Ono, M.: Effects of water and water-mimicking solvents on the lipase-catalyzed esterification in an apolar solvent Source, *Chem Lett*, (7) 1203-1206 (1990)

Krishna, HS., Divakar, S., Prapulla, SG., Karanath, NG.: Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*, *J Biotechnol*, **87** 193-201 (2001)

Krishna, HS., Manohar, B., Divakar, S., Prapulla, SG., Karanath, NG.: Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology, *Enzyme Microb Tech*, **26** 131-136 (2000)

Lamare, S., Legoy, MD., Graber, M.: Solid/gas bioreactors: powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications, *Green Chem*, **6** 445-458 (2004)

Langrand, G., Rondot, N., Triantaphylides C., Baratti, J.: Short chain flavor esters synthesis by microbial lipases, *Biotechnol Lett*, **12** 581-586 (1990)

Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J.: Lipase catalysed formation of flavor esters, *Biotechnol Lett*, **10** 549-554 (1988)

Lee, KKB., Poppenborg, LH., Stuckey, DC.: Terpene ester production in a solvent phase using reverse micelle-encapsulated lipase, *Enzyme Microb Tech*, **23** 253-260 (1998)

Letisse, F., Lamare, S., Legoy, MD., Graber, M.: Solid/gas biocatalysis: an appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis, *BBA-Gen Sub*, **1652** 27-34 (2003)

Letts, D., Chase, T.: Chemical modification of mushroom tyrosinase for stabilization to reaction inactivation, *Adv Exp Med Biol*, **42** 317-328 (1974)

Longo, MA., Combes, D.: Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J Biotechnol*, **58** (1) 21-32 (1997)

Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L.: Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnol Lett*, **23** 1529-1533 (2001)

Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L.: Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Chem Commun*, (7) 692-693 (2002)

Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L.: Enzymatic ester synthesis in ionic liquids, *J Mol Catal B: Enzym*, **21** (1-2) 9-13 (2003)

Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L.: Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *J Mol Catal A Chem*, **214** 113-119 (2004)

Lozano, P., de Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J. L.: Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids, *Biocatal Biotransform*, **23** 169-176 (2005)

Lozano, P., de Diego, T., Sauer, T., Vaultier, M., Gmouh, S., Iborra, J. L.: On the importance of the supporting *Candida antarctica* lipase B in material for activity of immobilized ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media, *J Supercrit Fluid*, **40** 93-100 (2007)

Lumry, R., Eyring, H.: Conformation changes of proteins, *J Phys Chem*, **58** 110-120 (1954)

Ma, L., Persson, M., Adlercreutz, P.: Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions, *Enzyme Microb Technol*, **31** (7) 1024-1029 (2002)

Machado, MF., Saraiva, JM.: Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids, *Biotechnol Lett*, **27** 1233-1239 (2005)

Magnusson, A.: *Doctoral dissertation*, School of Biotechnology, Department of Biochemistry, Royal Institute of Technology, KTH, AlbaNova University Center, Stockholm, Sweden, 12-16 (2005)

Magyar Élelmiszerkönyv, <http://www.omgk.hu/magyarelelmiszerk.htm>, 2008. augusztus 9.

Marták, J., Schlosser, Š.: Phosphonium ionic liquids as new, reactive extractants of lactic acid, *Chem Pap*, **60** 359-398 (2006)

Matsumoto, M., Ohashi, K.: Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*, *Biochem Eng J*, **14** (1) 75-77 (2003)

Maugard, T., Lamare, S., Legoy, MD.: Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast, *Biotechnol Bioeng*, **73** 164-168 (2001)

Mazur, AW., Hiler, GD., El-Nokaly, M.: Microemulsions and Emulsions in Food, *ACS Symp.*, **448** 51-61 (1991)

Miller, C., Austin, H., Posorske, L., et al.: Characteristic of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters, *J Am Oi. Chem Soc*, **65** 927-931 (1988)

Moreno, JM., Hernaiz, MJ., Sánchez-Montero, JM., Sinisterra, JV., Bustos, MT., Sánchez, ME., Bello, JF.: Covalent immobilization of pure lipases A and B from *Candida rugosa*, *J Mol Catal. B Enzym*, **2** 177-184 (1997)

Mozaev, VV., Martinek, K.: Inactivation and reactivation of proteins (enzymes), *Enzyme Microb Tech*, **4** (5) 299-309 (1982)

Mukherjee, KD., Kiewwitt, I.: Lipids containing very long chain monounsaturated acyl moieties in seeds of *Lunaria-annua*, *Phytochemistry*, **25** 401-404 (1986)

Mulder, M.: Basic Principles of membrane Technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2nd ed. (1996)

Nakamura, K., Kinoshita, M., Ohno, A.: Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalysed transesterification, *Tetrahedron*, **51** 8799-8808 (1995)

Ngo, HL., LeCompte, K., Hargens, L., McEwen, AB.: Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochim Acta*, **357** 91-102 (2000)

Novo, Novo Nordisk Product Sheet for Novozym 435, 2006

Okochi, M., Nakagawa, I., Kobayashi, T., Hayashi, S., Furasaki, S., Honda, H.: Enhanced activity of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase by addition of the co-solvent 1-butyl-3-methylimidazolium (L)-lactate in aqueous phase of biphasic systems for reductive production of steroids, *J Biotechnol*, **128** 376-382 (2007)

Oliveira, AC., Rosa, MF. Aires-Barros, MR., Cabral, JMS.: Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study, *J Mol Catal B Enzym*, **11** 999-1005 (2001)

Ollis, DL., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, SM., Harel, M., Remington, SJ., Silman, I., Schrag, J., Sussman, JL., Verschuere, KHG., Goldman, A.: The α / β -hydrolase fold, *Protein Eng*, **5** 197-211 (1992)

Otero, C., Pastor, E., Rua, ML., Ballesteros, A.: Hydrolysis and synthesis of butyrylglycerols by lipases, *Ann N Y Acad Sci*, **613** 523-528 (1990)

Otero, C., Rúa, ML., Robledo, L.: Influence of the hydrophobicity of lipase isoenzymes from *Candida rugosa* on its hydrolytic activity in reverse micelles, *FEBS Letters*, **360** 202-206 (1995)

Ottolina, G., Gianinetti, F., Riva, S., Carrea, G.: Solvent configuration influences enzyme-activity in organic media, *J Chem Soc-Chem Com*, (4) 535-536 (1994)

Özgülsün, A., Karaosmanoglu, F., Tüter, M.: Esterification reaction of oleic acid with fusel oil fraction for production of lubricating oil, *J Am Oil Chem Soc*, **77** 105-110 (2000)

van der Padt, A., Edema, MJ., Sewalt, JJW., et al.: Enzymatic acylglycerol synthesis in membrane bioreactor, *J Am Oil Chem Soc*, **67** (6) 347-352 (1990)

van der Padt, A., Keurentjes, JTF., Sewalt, JJW., van Dam, EM., van Dorp, LJ., van't Riet, K.: Enzymatic synthesis of monoglycerides in a membrane bioreactor with an in line adsorption column, *J Am Oil Chem Soc*, **69** 748-754 (1993)

Park, S., Kazlauskas, RJ.: Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology, *Curr Opinion Biotech*, **14** 432-437 (2003)

Perry, J H., Chilton, R H, Kirckpatrick, S D: *Vegyézmérnökök kézikönyve*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, (1968)

Persson M., Bornscheuer, UT.: Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J Mol Catal B: Enzym*, **22** 21-27 (2003)

Plechkova, NV., Seddon, KR.: Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chem Soc Rev*, **37** 123-150 (2008)

Poole, CF., Kersten, BR., Ho, SSJ., Coddens, ME., Furton, KJ.: Organic salts, liquid at room-temperature, as mobile phases in liquid-chromatography, *J Chromatogr*, **352** 407-425 (1986)

Pretti, C., Chiappe, C., Pieraccini, D., Gregori, M., Abramo, F., Monni, G., Intorre, L.: Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*), *Green Chem*, **8** 238-240 (2006)

Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (2008. július 28)

Pulvin, S., Legoy, MD., Lortie, R., Pensa, M., Thomas, D.: Enzyme technology and gas-phase catalysis - alcohol-dehydrogenase example, *Biotechnol Lett*, **8** 783-784 (1986)

van Rantwijk, F., Lau, R. M., Sheldon, R. A.: Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol*, **21** (3) 131-138 (2003)

van Rantwijk, F., Sheldon, RA.: Biocatalysis in ionic liquids, *Chem Rev*, **107** 2757-2785 (2007)

Razafindralambo, H., Blecker, C., Lognoy, G., Marlier, M., Wathlet, JP., Severin, M.: Improvement of enzymatic-synthesis yields of flavor acetates – the example of the isoamyl acetate, *Biotechnol Lett*, **16** 247-250 (1994)

Reetz, MT., Wiesenhöfer, W., Franció, G., Leitner, W.: Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase, *Chem Commun*, (9) 992-993 (2002)

Reetz, MT., Wiesenhöfer, W., Franció, G., Leitner, W.: Continuous flow enzymatic kinetic resolution and enantiomer separation using ionic liquid/supercritical carbon dioxide media, *Adv Synth Catal*, **345** 1221-1228 (2003)

Reichardt, C.: Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3rd ed., Wiley-VCH, Verlag, Weinheim, 419 (2003)

Rizzi, M., Stylos, P., Riek, A., Reuss, M.: A kinetic study of immobilized lipase catalysing the synthesis of isoamyl acetate by transesterification in n-hexane, *Enzyme Microb Tech*, **14** 709-714 (1992)

Romero, MD., Calvo, L., Alba, C., Danesfar, A., Ghaziaskar, HS.: Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane, *Enzyme Microb Tech*, **37** 42-48 (2005a)

Romero, MD., Calvo, L., Alba, A., Habulin, M., Primožic, M., Knez, Z.: Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide, *J Supercrit Fluid*, **33** 77-84 (2005b)

Romero, MD., Calvo, L., Alba, C., Danesfar, A.: A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane, *J Biotechnol*, **127** 269-277 (2007)

Ross, N., Schneider, H.: Activities of *Candida rugosa* lipase and other esterolytic enzymes coated on glass-beads and suspended in substrate and water-vapor – enzymes in thin liquid-films, *Enzyme Microb Tech*, **13** 370-377 (1991)

Scurto, AM., Aki, SNVK., Brennecke, JF.: CO₂ as a separation switch for ionic liquid/organic mixtures, *J Am Chem Soc*, **124** 10276-10277 (2002)

Schwarzenbach, RP., Gschwend, PM., Imboden, DM.: Environmental Organic Chemistry, John Wiley & Sons, New York (1993)

Segel, IH.: Enzyme Kinetics and Mechanism, Wiley-Interscience, New York, (1975)

Selmi, B., Gontier, E., Ergun, F., Thomas, D.: Enzymatic synthesis of tricapylin in a solvent-free system: Lipase regiospecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel, *Biotechnol Tech*, **11** 543-547 (1997)

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, UC.: Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnol Adv*, **19** 627-662 (2001)

de Souza, RF., Padilha, JC., Gonçalves, RS., Dupont, J.: Room temperature dialkylimidazolium ionic liquid-based fuel cells, *Electrochem Commun*, **5** 728-731 (2003)

Straathof, AJJ., Jongejan, JA.: The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction, *Enzyme Microb Technol*, **21** 559-571 (1997)

Swatloski, RP., Holbrey, JD., Rogers, RD.: Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, *Green Chem*, **5** 361-365 (2003)

Tawaki, S., Klivanov, AM.: Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent, *J Am Chem Soc*, **114** 1882-1884 (1992)

Taylor, KB.: Enzyme Kinetics and Mechanism, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (2002)

Tsai, SW., Tsai, C.-S., Chang, C.-S.: Lipase-catalysed synthesis of (S)-naproxen ester prodrug by transesterification in organic solvents, *Appl Biochem Biotech*, **80** 205-219 (1999)

Tsujioka, Y., Okumura, S., Iwai, M.: Glyceride synthesis by 4 kinds of microbial lipase, *Biochim Biophys Acta*, **489** 415-422 (1977)

Uppenberg, J., Öhrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, GJ., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, TA.: Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols, *Biochemistry*, **34** 16838-16851 (1995)

Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T., Jones, TA.: Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase-B from *Candida-antarctica*, *J Mol Biol*, **235** 790-792 (1994)

Vija, H., Telling, A., Tougu, V.: Lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in hexane, *Bioorg Med Chem Lett*, **7** 259-262 (1997)

Vulfson, EN., Halling, PJ., Holland, HL.: Enzymes in nonaqueous Solvents, Methods and Protocols, Humana Press Totowa, (2001)

Wasserscheid, P., van Hal, R., Bösmann, A.: 1-n-Butyl-3-methylimidazolium ([bmim]) octylsulfate - an even 'greener' ionic liquid, *Green Chem*, **4** 400-404 (2002)

Welsh, FW., Murray, WD., Williams, RE.: Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals, *Crit Rev Biotechnol*, **9** 105-169 (1989)

Welsh, FW., Williams, RE., Dawson, KH.: Lipase mediated synthesis of low-molecular-weight flavor esters, *J Food Sci*, **55** 1679-1682 (1990)

Welton, T.: All solutions have a solvent, *Green Chem*, **8** 13 (2006)

Yadav, G.D., Lathi, P.S.: Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases, *Biochem Eng J*, **16** 245-252 (2003)

Yahya, ARM., Anderson, WA., Moo-Young, M.: Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions, *Enzyme Microb Tech*, **23** 438-450 (1998)

Yamaguchi, S., Mase, T.: High yield synthesis of monoglyceride by monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *penicillium camemberit*, *J Ferment Bioeng*, **72** 162-167 (1991)

Yanes, EG., Gratz, SR., Baldwin, MJ., Robinson, SE., Stalcup, AM.: Capillary electrophoretic application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *Anal Chem*, **73** 3838-3844 (2001)

Yang, Z., Pan, W.: Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis, *Enzyme Microb Tech*, **37** 19-28 (2005)

Yang, YC., Vali, SR., Ju, YH.: A process for synthesizing high purity monoglyceride, *J Chin Inst Chem Eng*, **34** 617-623 (2003)

Zaidi, A., Gainer, JL., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., Mir, A.: Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects, *J Biotechnol*, **93** 209-216 (2002)

Zaks, A., Klivanov, AM.: Substrate-specificity of enzymes in organic-solvents vs. water is reversed, *J Am Chem Soc*, **108** 2767 (1986)

Zhao, H.: Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids, *J Mol Catal B-Enzym*, **37** 16-25 (2005)

6. PUBLIKÁCIÓK

a) Közlemények

1. **Gubicza, L.**, Szakács-Schmidt, A.: Online water removal during enzymatic asymmetric esterification in organic media, *Biotechnol Techn*, **9** (9) 687-690 (1995).
2. **Gubicza, L.**, Kelemen-Horvath, I.: Control of enzyme activity and enantioselectivity by solvent engineering, *Med Fac Landbouww Univ Gent*, **61** 1361-1367 (1996).
3. Ulbert, O., Szarka, Á., Halasi, B., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Action of *Candida rugosa* lipase in carvone isomers as solvents, *Biotechnol Techn*, **13** (5) 299-302 (1999).
4. **Gubicza, L.**, Kabiri-Badr, A., Keoves, E., Bélafi-Bakó, K.: Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal, *J Biotechn*, **84** (2) 193-196 (2000).
5. Bélafi-Bakó, K., Kabiri-Badr, A., Dörmő, N., **Gubicza, L.**: Pervaporation and its application as downstream or integrated process, *Hung J Ind Chem*, **28** 175-9 (2000).
6. **Gubicza, L.**, Székely, K., Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K.: Enhancement of the thermostability of *Candida cylindracea* lipase by medium engineering, *Chem Papers*, **54** (6a) 351-354 (2000).
7. Bélafi-Bako, K., Dormo, N., Ulbert, O., **Gubicza, L.**: Application of pervaporation for removal of water produced during enzymatic esterification in ionic liquids, *Desalination*, **149** (1-3) 267-268 (2002).
8. Bélafiné Bakó K., Ulbert O., Fráter T., **Gubicza L.**: Enzimatis észterezés ionos folyadékban: a keletkező víz eltávolítása pervaporációval, *Membrántechnika* **6**(3) 42-47 (2002).
9. **Gubicza, L.**, Nemestóthy, N., Fráter, T., Bélafi-Bakó, K.: Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal, *Green Chem*, **5** (2) 236-239 (2003).
10. Ehrenstein, U., Kabasci, S., Kümmel, R., Dörmő, N., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Development of an integrated process for the production of natural aroma esters, *Chem Ing Techn*, **75** 291-294 (2003).
11. Bélafi-Bako, K., Badr, AK., Nemestothy, N., Ehrenstein, U., **Gubicza, L.**: Kinetics of ethyl acetate formation by lipase in organic solvent and solvent-free system, *Chem Pap*, **57** (4) 278-281 (2003).
12. Fráter, T., Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Thermal stability of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids, *Comm Agricult Appl Biol Sci*, **68** 293-296 (2003).
13. Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.: Developments of resolution reaction catalysed by lipases in non-conventional media: production of chiral carboxylic acids possessing biological activity, *Chem Listy*, **97** 348 (2003).
14. Dörmő N., Búcsú D., Kovács S., Bélafiné Bakó K., **Gubicza L.**: Környezetbarát biokenőanyag előállítása zsírsavból enzimes észterezéssel oldószermentes közegben, *Olaj, Szappan, Kozmetika*, **53** 105-109 (2004).
15. Ulbert, O., Frater, T., Bélafi-Bako, K., **Gubicza, L.**: Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents, *J Mol Catal B-Enzym*, **31** (1-3) 39-45 (2004).
16. Dormo, N., Bélafi-Bakó, K., Bartha, L., Ehrenstein, U., **Gubicza, L.**: Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system, *Biochem Eng J*, **21** (3) 229-234 (2004).
17. Ulbert, O., Bélafi-Bako, K., Tónova, K., **Gubicza, L.**: Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase using ionic liquids, *Biocatal Biotransfor*, **23** (3-4) 177-183 (2005).
18. Frater, T., **Gubicza, L.**, Szollosy, A., Bakos J.: Enantioselective hydrogenation in ionic liquids: Recyclability of the [Rh(COD)(DIPAMP)]BF₄ catalyst in [bmim][BF₄], *Inorg*

- Chim Acta*, **359** (9) 2756-2759 (2006).
19. Tonova, K., Lazarova, Z., Nemestóthy, N., **Gubicza, L.**, Bélafi-Bakó, K.: Lipase catalysed esterification in a reversed micellar system, *Chem Ind Chem Eng Quaterly* **12** 175-180 (2006).
 20. **Gubicza L.**: Enzimkatalitikus reakciók ionos folyadékokban. *Magyar Kémiai Folyóirat*. **113** 116-120 (2007).
 21. Fehér, E. Major, B., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids, *Biochem. Soc. T.*, **35** 1624-1627 (2007).
 22. Nemestóthy, N., **Gubicza, L.**, Fehér, E., Bélafi-Bakó, K.: Biotechnological utilisation of a food industrial by-product: fusel oil; a kinetic model on enzymatic esterification of i-amyl alcohol and oleic acid by *Candida antarctica* lipase B, *Food Technol Biotech*, **46** (1) 44-50 (2008).
 23. Fehér, E., Illeova, V., Kelemen-Horváth, I., Bélafi-Bakó, K., Polakovic, M., **Gubicza, L.**: Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid-alcohol biphasic system, *J. Mol Cat B Enzym*, **50** 28-32 (2008).
 24. Fehér, E., Major, B., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Semi-continuous enzymatic production and membrane assisted separation of isoamyl acetate in alcohol - ionic liquid biphasic system, *Desalination*, **240** (2009).
 25. Ziobrowski, Z., K. Kiss, A. Rotkegel, N. Nemestóthy, R. Krupiczka, **Gubicza, L.**: Pervaporation aided enzymatic production of glycerol monostearate in organic solvents, *Desalination*, **240** (2009).
 26. **Gubicza, L.** Bélafi-Bakó, K., Fehér, E., Fráter, T.: Waste-free process for continuous flow enzymatic esterification in ionic liquid medium. *Green Chem*, **11** (2009), nyomtatásban,
 27. **Gubicza, L.**, Szakács-Schmidt, A., Eisenreich, Z., Ujhidy, A., Hodossy, L., Gémes, I., Drozda, T.: Eljárás aroma észterek előállítására enzimkatalitikus reakcióval. 212 673 lajstromszámú magyar szabadalom (1996).
 28. **Gubicza, L.**, Szakács-Schmidt, A., Eisenreich, Z., Ujhidy, A., Hodossy, L., Gémes, I., Drozda, T.: Process for the preparation of aroma esters by an enzyme catalytic reaction. EP 0 655 087 (1997).
 29. Kelemen-Horváth, I., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Production of bioflavours by enzymatic esterification. In: *Indo-Hungarian Symp. Appl. Biotechn. in Chem. Pharmaceutical Ind., Calcutta* (India) pp. 77-86 (1998).
 30. Tihanyi, O., Halasi, Sz., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Several parameters influence the enzyme's acting: can the enzymes be affected by chiral solvents? In: *Indo-Hungarian Symp. Appl. Biotechn. in Chem. Pharmaceutical Ind., Calcutta* (India) pp. 99-106 (1998)
 31. Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Biocatalysts and Membranes, In: *Integration of Membrane Processes into Bioconversions*, ed. by Bélafi-Bakó, K. Gubicza, L., Mulder, M., Kluwer Academic, London, 2000 pp. 131-140.
 32. Bélafi-Bakó, K., Dörmő, N., Rodrigues, C., Schäfer, T., Crespo, J.G., **Gubicza, L.**: Enzymatic esterification coupled with pervaporation for natural flavour ester production, In: *Proc. Engineering with membranes, Granada*, (Spanyolország) Vol. I. pp. 287-291 (2001).

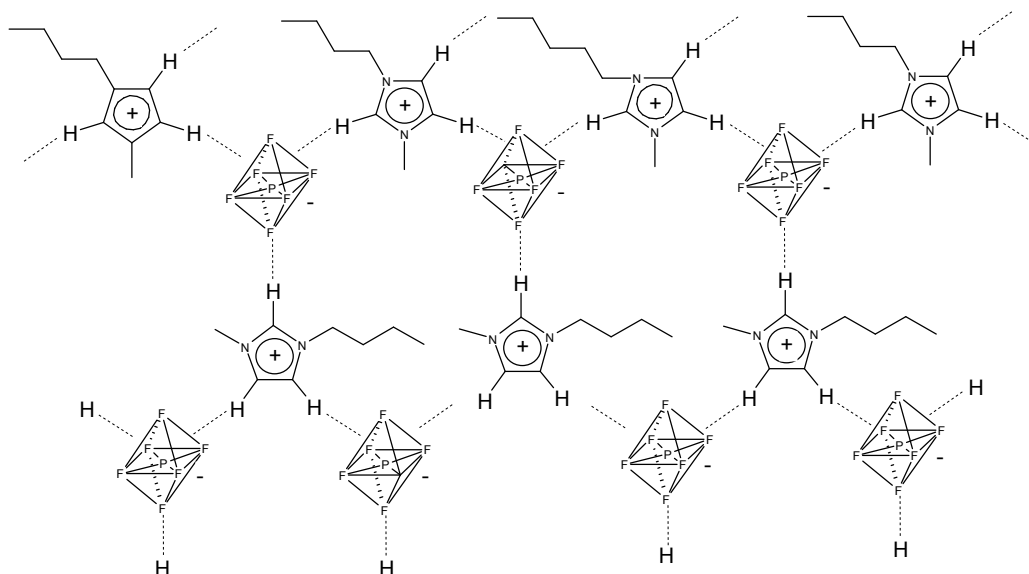
b) Konferencia proceedingek

33. **Gubicza, L.**, Szakács-Schmidt, A., Hodossy, L.: Herstellung von Aromaestern durch lipase-katalysierte Veresterung in organischen Lösungsmitteln. *ACHEMA 1994*, Frankfurt/M. pp. 87-89.
34. **Gubicza, L.**, Szakács-Schmidt, A.: Lipase-catalysed asymmetric esterification in organic media at controlled water content. *Biochemical Engineering 3*, Stuttgart, 1995, pp. 37-39.
35. **Gubicza, L.**: Lipase-katalysierte production of natural flavour esters. *Bulgarian-Hungarian Workshop '96*, Veszprém, 1996, pp. 57-61.
36. **Gubicza, L.**, Bodnár, J., Ujhidy, A.: Lipasekatalysierte Trennung von Carboxylsäuren durch enantioselektive Veresterung. *ACHEMA 1997*, Frankfurt/M. pp. 113-114.
37. **Gubicza, L.**, Bélafi-Bakó, K., Tihanyi, O.: Medium engineering: Eine Methode für die Kontrolle der Aktivität und Enantioselektivität von Enzymen. *DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Wiesbaden, 1998 pp. 172-173.
38. **Gubicza, L.**, Tihanyi, O.: Possibilities of enzymatic resolutions, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 1998. április 24-27. Proceedingek, pp. 87-89 (1998).
39. Kelemen-Horváth, I., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Production of bioflavours by enzymatic esterification. *Proc. Indo-Hungarian Symp. Appl. Biotechn. in Chem. Pharmaceutical Ind., Calcutta* (India) pp. 77-86 (1998).
40. Tihanyi, O., Halasi, Sz., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Several parameters influence the enzyme's acting: can the enzymes be affected by chiral solvents? *Proc. Indo-Hungarian Symp. Appl. Biotechn. in Chem. Pharmaceutical Ind., Calcutta* (India) pp. 99-106 (1998).
41. Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Effect of chiral solvents on reactions catalysed by lipase in non-conventional media. *DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Wiesbaden, 1999, pp. 327-328.
42. Dörmő N., Kabiri Badr, A., Ehrenstein, U., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Fusel oil- source for the production of natural flavour esters. *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, Proceedingek, pp. 219-224 (2000).
43. Nagy M., Székely K., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Increasing enzyme thermostability in non-conventional media. *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, Proceedingek, pp. 225-230 (2000).
44. **Gubicza, L.**, Bélafi-Bakó, K.: Solvent engineering: Possibilities and limitations. *ACHEMA 2000*, Frankfurt/M. 2002. pp. 93-94.
45. Koszorz, Z., Bélafi-Bakó, K., Krupiczka, R., **Gubicza, L.**, Ziobrowski, Z.: Esterification of acetic acid and ethanol coupled with pervaporation for water removal, *Proc. Ann. Memb. Techn. Conf., Tata*, pp. 43-5 (2000).
46. Ehrenstein, U., Kabasci, S., Kümmel, R., Kabiri Badr, A., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Enzymatic esterification with continuous water removal. *Proc. 11th World Congress on Biotechnology, Berlin*, (Németország) Vol. 4. pp.477-479 (2000).
47. Ehrenstein, U., Kabasci, S., Kümmel, R., Dörmő, N., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Enzymatische Veresterung von Isoamylalkohol, *Proc. 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig*, (Németország) pp.193-195 (2001).
48. Bélafi-Bakó, K., Dörmő, N., Rodrigues, C., Schäfer, T., Crespo, J.G., **Gubicza, L.**: Enzymatic esterification coupled with pervaporation for natural flavour ester production, *Proc. Engineering with membranes, Granada*, (Spanyolország) Vol. I. pp. 287-291 (2001).
49. Székely K., Ulbert O., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Effect of the solvents on the thermostability of *Candida rugosa* lipase, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2001, április 20-23. Proceedingek, pp. 143-148 (2001).
50. Dörmő N., Bélafiné Bakó, K., **Gubicza, L.**: Production of biolubricants from fusel oil. *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2001, április 20-23, Proceedingek, pp. 149-153 (2001).

51. Dörmő, N., Rodriques, C., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Integration of enzymatic esterification and pervaporation for the production of natural flavour esters, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2001, április 20-23, Proceedings, pp. 154-158 (2001).
52. Dörmő, N., **Gubicza, L.**, Bélafi-Bakó K.: Study on an enzymatic reaction integrated with pervaporation, *Proc. Ann. Memb. Techn. Conf., Tata*, pp. 69-72 (2001).
53. Dörmő, N., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Enzymatic production of natural flavour esters in an integrated process, *Proc. Membrane Summer School „Using membranes to Assist in Cleaner Processes”*. Ladek Zdrój, (Lengyelország) pp. 125-130 (2001).
54. Koszorz, Z., Nemestóthy, N., Dörmő, N., Ziobrowski, Z., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Enzymatic esterification enhanced by pervaporation, *Proc. 4th. Sci. Conf. Membranes and Membrane Processes in Environmental Protection*, Zakopane, (Lengyelország), 2002, pp. 189-195.
55. Ulbert O., Mikó O., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Enantioselective esterifications using *Candida rugosa* lipase, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2002, április 14-17, Proceedings, pp. 237-242.
56. Mikó O., Ulbert O., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Using solvent engineering for increasing of the thermostability of mezofile enzymes, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2002, április 14-17, Proceedings, pp. 243-246.
57. Nemestóthy, N., Dörmő, N., Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Study on the kinetic mechanism of esterification catalysed by lipase enzyme, *Proc. 29th Int. Conf. SSCHE*, Tatranska Matliare, (Szlovákia), 2002, CD-rom.
58. **Gubicza, L.**, Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K.: Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal. *Green Solvents for Catalysis*. Bruchsal, Germany, 13-16 October 2002. pp. 73-74.
59. Fráter T., Bélafiné Bakó K., **Gubicza L.**: Enzyme catalytic esterification in ionic liquids, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2003, április 8-10, Proceedings, pp. 300-304.
60. Nemestóthy N., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Investigation of complex enzymatic reactions, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2003, április 8-10, Proceedings, p. 342-347.
61. **Gubicza, L.**, Nemestóthy, N., Fráter, T., Bélafi-Bakó, K.: Enzymatic esterification in ionic liquids at constant water activity. *ACHEMA 2003*, Frankfurt/M. pp. 27-28 (2003).
62. **Gubicza, L.**: Enzymatic enantioselective esterification in ionic liquids, *Proc. Days of Chem. Eng., Veszprém*, 2004, pp. 25-31.
63. Ulbert, O., K. Bélafi-Bakó, K. Tónova, **Gubicza, L.**: Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase using ionic liquids, *ProtStab* 2004, 26-29 September 2004, Bratislava. pp. 267-270.
64. **Gubicza, L.**, Fráter, T., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K.: Enzymatic Production of Short Chain Alkyl Esters in Solvent-free System and Ionic Liquids. *Green Solvents for Synthesis*. Bruchsal, Germany, 3-6 October 2004. pp. 107-108.
65. **Gubicza, L.**, Fráter T., Kelemenné Horváth I., Bélafiné Bakó K.: Production of short chain esters in organic solvents, solvent-free system and ionic liquids, *Műszaki Kémiai Napok '05, Veszprém*, 2005. április 26-28. Proceedings 282-285.
66. Fráter, T., Kiss, K., Bélafi-Bakó, K., Ziobrowski, Z., **Gubicza, L.**: Enzymatic synthesis of monoglycerides, *Proc. 33rd Int. Conf. SSCHE, Tatranské Matliare*, Slovakia, 2006, CD-rom.
67. Kiss K., Kelemenné Horváth I., Ziobrowsky, Z., **Gubicza, L.**: Production of glycerol monostearate at constant water content, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2006, Proceedings, pp. 75-78.
68. Fráter T., Fehér E., Kelemenné Horváth I., Bélafiné Bakó K., **Gubicza, L.**: Production of flavour esters in ionic liquids, *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2006, Proceedings, pp. 79-82.

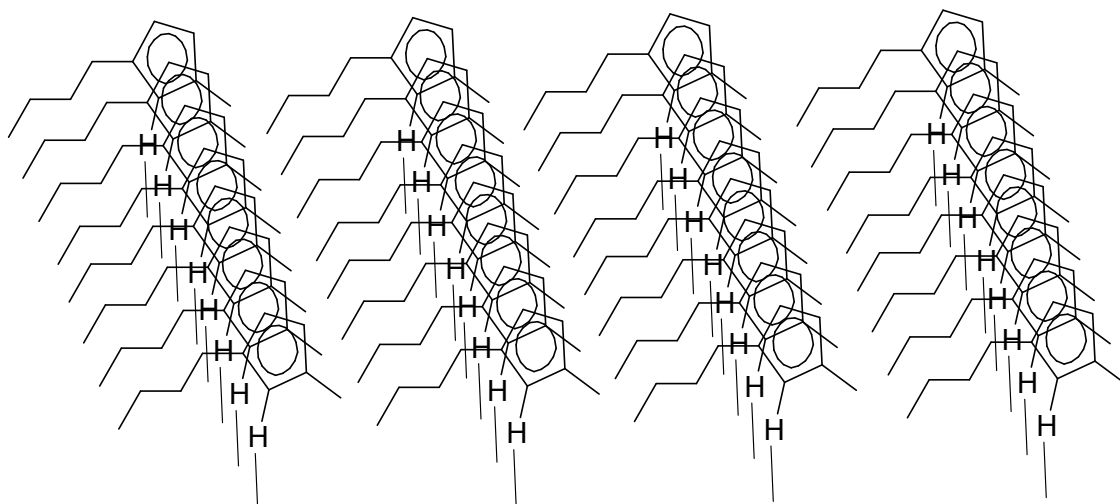
69. Fehér, E., Fráter, T., **Gubicza, L.**, Štefuca, V., Illeova, V., Polakovič, M.: Enzymatic production of short chain alkyl esters in ionic liquids, *Proc. 33rd Int. Conf. SSCHE, Tatranské Matliare*, Slovakia, 2006, CD-rom.
70. **Gubicza, L.**, Fráter, T., Belafi-Bako, K.: Reuse of lipase enzymes in ionic liquid solvents. *ACHEMA2006*, Frankfurt am Main, 15-19 May 2006, Proceedings of „Green solvents for Environmentally friendly processes”. p.111-112.
71. **Gubicza, L.**, Fehér, E., Kelemen-Horváth, I., Belafi-Bako, K.: Continuous enzymatic esterification in an integrated system using ionic liquids as solvent. *Green Solvents for Processes*. Lake Constance, Friedrichshafen, 8-11 October 2006. pp. 110-111.
72. **Gubicza, L.**, Fehér, E., Kelemen-Horváth, I., Bélafi-Bakó, K., Fráter, T.: Enzymatic flavour ester production in organic solvents, solvent-free system and ionic liquid. *ESBES 6*, Salzburg, 27-30 2006, Proceedings, 277 -279.
73. Fehér E., Forgó K., Kelemenné Horváth I., **Gubicza, L.**: Biphase Enzymatic Production of Isoamyl Acetate in Ionic Liquid, *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2007. április 25-27, pp. 128-132.
74. Fehér, E., K. Forgó, I. Kelemenné Horváth, K. Bélafiné Bakó, **Gubicza, L.**: Biphase Enzymatic Production of Isoamyl Acetate in Ionic Liquid and Separation of the Reaction Mixture, *34th International conference of the Slovak Society of Chemical Engineering (SSCHE)*, Tatranské Matliare, Szlovákia, 2007. május 21-25., pp. 226 és proceedings CD-ROM.
75. Fehér, E., T. Fráter, I. Kelemen-Horváth, B. Major, K. Bélafi-Bakó, **Gubicza, L.**: Continuous Enzymatic Production of Natural Flavours in One- and Biphase Systems with Different Membrane Separation Technics, *PERMEA*, Siófok, 2007 szeptember 2-6., pp. 225 és proceedings CD-ROM.
76. Illeová, V., E. Fehér, M. Polakovič, **Gubicza, L.**: Thermal Stability of Lipase in Ionic Liquids, *34th International conference of the Slovak Society of Chemical Engineering (SSCHE)*, Tatranské Matliare, Szlovákia, 2007. május 21-25. 212 és proceedings CD-ROM.
77. **Gubicza, L.**, E. Fehér, K. Bélafi-Bakó, N. Nemestóthy, T. Fráter: Continuous Enzymatic Esterification in an Integrated System Using Ionic Liquids as Solvent, *European Bioprospectives*, Cologne, Németország, 2007. május 30 - június 1. pp. 87-89.
78. Fehér, E., I. Kelemen-Horváth, K. Bélafi-Bakó, **Gubicza, L.**: Biphase Enzymatic Esterification of a Natural Flavour in a Continuous System, *8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Oviedo, Spanyolország, 2007. július 8-13. Proceedings pp. 294-297.
79. Fehér, E., I. Kelemen-Horváth, B. Major, K. Bélafi-Bakó, **Gubicza, L.**: Continuous Enzymatic Production of Isoamyl Acetate in Ionic Liquid – Alcoholic Biphase System, *7th International conference on Protein Stabilisation*, Exeter, Anglia, 2007. április 10-13. pp.120-123.
80. Fehér, E., K. Forgó, I. Kelemenné Horváth, K. Bélafiné Bakó, **Gubicza, L.**: Biphase Enzymatic Production of Isoamyl Acetate in Ionic Liquid and Separation of the Reaction Mixture, *34th International conference of the Slovak Society of Chemical Engineering (SSCHE)*, Tatranské Matliare, Szlovákia, 2007. május 21-25. CD-ROM:
81. Fehér, E., F. Zvezdana, K. Bélafi-Bakó, K., **Gubicza, L.**: Application of solvent engineering in the enzymatic production of isoamyl acetate. *Műszaki Kémiai Napok, Veszprém*, 2008. április 22-24. Proceedings, pp.134-137.
82. Vincze, R., E. Fehér, S. Kovács, **Gubicza, L.**: Application of ionic liquid assisted extractive distillation for the separation of isoamyl alcohol – isoamyl acetate azeotropic mixture. *Műszaki Kémiai Napok*, Veszprém, 2008. április 22-24. Proceedings, pp.138-141.

7. FÜGGELÉK



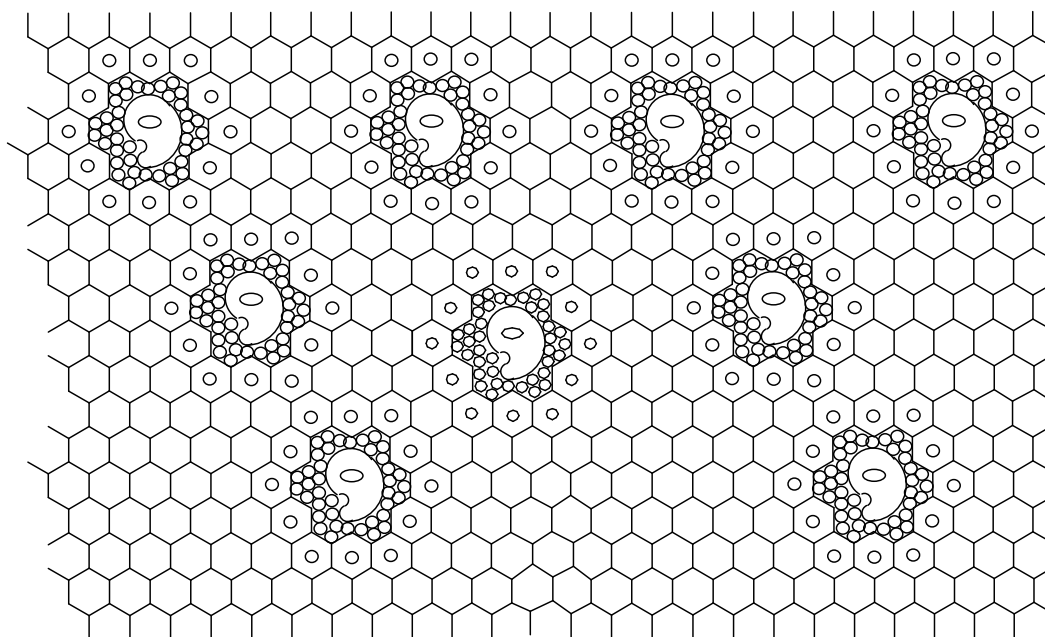
F-1. ábra: A [bmim]PF₆ ionos folyadék kétdimenziós szerkezete.

A két- és háromdimenziós szerkezetben egy összefüggő H-kötés hálózat található. Az imidazolium gyűrű három H-atomja kötést hoz létre a nemkötő elektrópárral rendelkező PF₆⁻-ion nagy elektronegativitású F-atomjaival. A kötés létrehozásában főleg az egyenlítői F-atomok vesznek részt. Így, ebben az esetben, minden egyes PF₆⁻-iont három imidazolium-kation vesz körül és vice versa [Fehér, 2007].



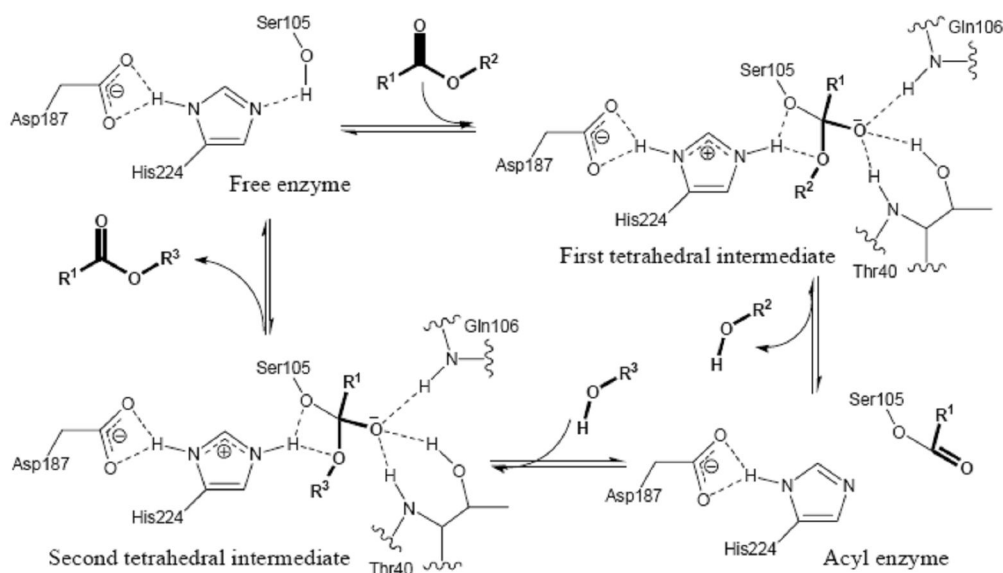
F-2. ábra: Visszaszórás spektroszkópiai eredmények az imidazolium-gyűrűk felszíni elhelyezkedéséről.

Az imidazolium-gyűrűk lapjukra elrendeződve, vízszintesen helyezkednek el, így képezve a gyűrűkből és az alkil-csoportokból egy összefüggő apoláris láncolatot a felszínen. Az anion töltéssel rendelkező részei és a H-kötéssel kapcsolódó kationok befelé orientálódnak. Ezen rendezett felszín létrehozásában Coulomb és van der Waals kölcsönhatások is szerepet játszanak, amelyek az ábrán nincsenek feltüntetve [Fehér, 2007].



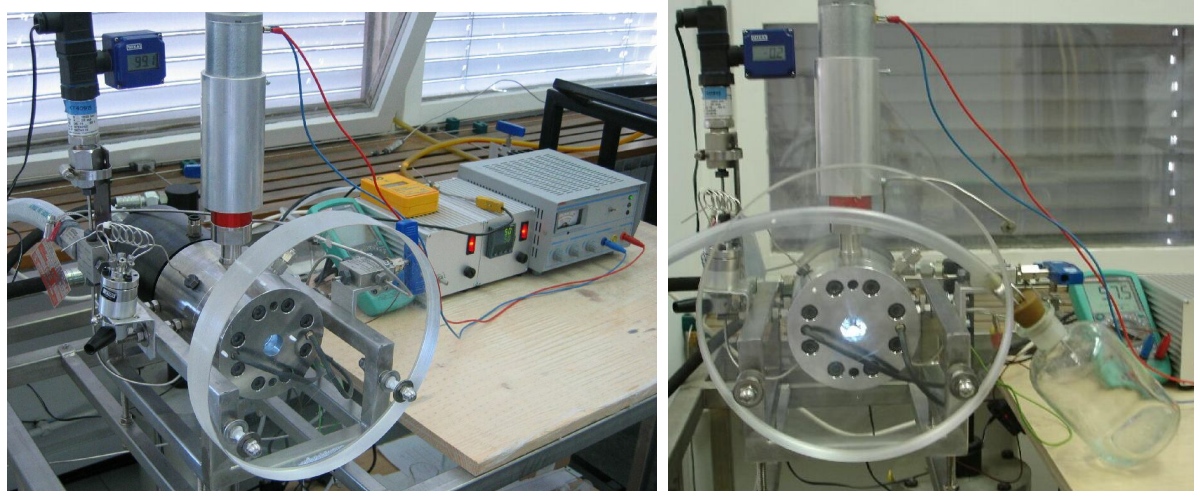
F-3. ábra: Enzimstabilizáció ionos folyadékok H-kötései által létrehozott rendezett struktúrában.

Az ionos folyadékok körülzárják az enzimet és a körülötte lévő monomolekuláris rétegnyi vizet, így erős stabilizáló hatást fejtenek ki hő- és egyéb hatásokkal szemben. Az enzimek és bármilyen egyéb makromolekulák csapdába esnek az ionos folyadékok alkotta H-kötés hálóban, létrehozva különböző poláris és apoláris régiójú nanoszerkezeteket, amelyekben sztérikus és elektrosztatikus kölcsönhatások alakulnak ki [Fehér, 2007].



F-4. ábra: A CALB által katalizált reakciók ping-pong bi-bi mechanizmusa.

A szabad enzimből (balra fent) az első szubsztráttal egy tetraédes intermedier képződik (jobbra fent). Az első termék távozása után létrejön egy acil-enzim átmeneti állapot (jobbra lent). A második szubsztrát érkezésével, egy újabb második tetraédes intermedier képződik (balra lent), majd a második termék távozása után az enzim készen áll egy újabb katalitikus ciklusra [Magnusson, 2005].



F-5. ábra: Nagynyomású berendezés enzimkatalitikus észterezéshez (Maribori Egyetem).

Bal oldalt a nyomás és hőmérséklet érzékelőkkel, szabályzókkal, mintavevővel felszerelt cella képe található reakció közben. Jobb oldalt a CO₂ és a reakcióelegy ürítése látható. Középen az 5 cm vastag biztonsági plexi üvegen keresztül a megvilágított reakciótér látható, a belőle mechanikus keverővel.



F-6. ábra. A pervaporációs berendezés fényképe

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Markó László akadémikus úrnak, a Műszaki Kémiai Kutató Intézet korábbi igazgatójának, aki felhívta figyelmemet a szerves oldószerekben lejátszódó enzimkatalitikus reakciók jelentősége, és iránymutató tanácsaival segítette munkámat.

Megköszönöm a Műszaki Kémiai Kutató Intézet jelenlegi és volt igazgatóinak, hogy lehetővé tették munkám folytatását.

Volt és jelenlegi PhD hallgatóimnak és diplomázóimnak, így dr. Amir Kabiri Badrnek, dr. Fráter Tamásnak, dr. Fehér Erikának, Major Brigittának, Ulbert Olgának, Dörmő Nórának, Kiss Katalinnak, Székely Katalinnak, Mikó Orsolyának, Viszlay Renátának, Fenyvesi Helgának köszönettel tartozom kitartó kutató munkájukért, fiatalos, újat kereső gondolkodásmódjukért, találékonyságukért, lelkesedésükért.

Köszönetet mondok közvetlen munkatársaimnak, Szakácsné dr. Schmidt Anikónak, dr. Kovács Sándornak, dr. Nemestóthy Nándornak, dr. Koroknai Balásznak, Kelemenné Horváth Ilonának, dr. Molnár Ferencnének, Lövitusz Évának, Csanádi Zsófiának, Molnár Eszternek, Cserjési Petrának, Molnár Viktóriának, Kiss Lászlónak, Répási Ottónak, Kanyár Józsefnének, Veingartner Józsefnének, Havasi Ferencnek munkám kivitelezésében és a dolgozat elkészítésében nyújtott támogatásukat.

Külön köszönöm Bélafiné dr. Bakó Katalin kolléganőmnek szakmai és emberi támogatását, tanácsait, a lefolytatott inspiráló, kemény vitákat, amelyek nagyban segítettek dolgozatom elkészítésében.

Köszönettel tartozom a hazai és nemzetközi vállalatoknak, intézményeknek, akik eszközökkel, megbízásokkal, külföldi együttműködő partnereimnek, akik műszerekkel, közös gondolkodással és ötletekkel segítették kutatásomat.

Köszönöm tágabb családom megértését, türelmét, segítségét és biztatását.